eDNA 监测空间分辨率量化的方法研究：以长江中游平水期为例 *

杨海乐，许兰馨，周琼，刘志刚，吴金明 **

（中国水产科学研究院长江水产研究所，武汉 430223）

摘　要：长江中游是长江极为重要的自由流淌河段，为中华鲟、长江江豚等水生生物提供了关键生境，开展常态化系统化 eDNA (environmental DNA)监测对域内水生生物多样性评估和保护具有重要意义。eDNA 监测的空间分辨率未量化限制了长江中游常态化 eDNA 监测的实施。为了量化长江中游 eDNA 监测的空间分辨率，我们探索建立了一个基于黑箱模型、简化过程和概率化表述的量化方法。本研究 2020 年 6 月（平水期）在长江中游设置 30 个采样断面，断面间隔在 30 km 左右，开展 eDNA 采样，进行高通量测序（原核生物用 16S rRNA 基因扩增子测序、真核生物用线粒体 *COI* 基因扩增子测序），根据流域生物信息流分析框架计算 eDNA 所能监测到的生物信息输移的量化特征，确定 eDNA 监测空间分辨率（系列）值及其可信度、覆盖度。结果显示长江中游平水期 eDNA 所能监测到的原核生物的生物信息输移能力为 99.91%/km，非生命个体生物信息输移占比 23.83%，非生命个体生物信息输移半衰距离为48.45 km；真核生物的eDNA 输移能力为99.85%/km，非生命个体生物信息输移占比67.93%，非生命个体生物信息输移半衰距离为 30.00 km。eDNA 监测空间分辨率可信度和覆盖度之间存在权衡，原核生物 eDNA 监测空间分辨率的可信度与覆盖度平衡点在 39 km，特征值在 86%左右，真核生物 eDNA 监测空间分辨率的可信度与覆盖度平衡点在 28 km，特征值在 65%左右。研究建议不同监测目的可以根据需要选择不同监测空间分辨率：以河段单元内的物种组成为目的的监测，可优先覆盖度、牺牲可信度选择 eDNA 监测空间分辨率；以生物多样性空间结构为目的的监测，可优先可信度、牺牲覆盖度选择 eDNA 监测空间分辨率。原核生物 90%以上覆盖度对应的空间分辨率为 27 km（可信度为 84.18%），真核生物 90%以上覆盖度对应的空间分辨率为 6 km（可信度为 41.38%），80%以上覆盖度对应的空间分辨率为 13 km（可信度为 50.64%）；原核生物 90%以上可信度对应的空间分辨率为 58 km（覆盖度为 82.30%），真核生物 90%以上可信度对应的空间分辨率为 78 km（覆盖度为 38.61%），80%以上可信度对应的空间分辨率为 50 km（覆盖度为 49.70%）。本研究可为长江中游 eDNA 监测断面设置提供量化参考，为其它河流或河段 eDNA 监测分辨率估算提供方法借鉴。

关键词：长江中游，环境 DNA 监测，空间分辨率，可信度，覆盖度，流域生物信息流，流域生态学

Quantifying the spatial resolution of eDNA monitoring: a case study in Middle Yangtze River in mean-flow period

Yang Haile, Xu Lanxin, Zhou Qiong, Liu Zhigang, Wu Jinming **

(*Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of P.R.China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China*)

Abstract: The middle reach of Yangtze River is the most important free flowing reach in main stream of Yangtze River, which provides key habitats for Chinese sturgeon, Yangtze finless porpoise and other aquatic organisms. Normalized and systemic eDNA (environmental DNA) monitoring is very helpful for aquatic biodiversity monitoring, assessment and conservation. The lack of quantified spatial resolution of eDNA monitoring hinders the implement of normalized and systemic eDNA monitoring in the middle reach of Yangtze River. To quantifying the spatial resolution of eDNA monitoring in the middle reach of Yangtze River, we explored a quantification method based on black-box model, simplified ecological processes and the statistical representation of spatial resolution. The current study set 30 sampling transections in the middle reach of Yangtze River with an approximate 30 km runoff distance between adjacent transections, and then according to eDNA sampling in mean-flow period, next generation sequencing and watershed biological information flow (WBIF) analyzing, quantified the characteristics of eDNA monitoring spatial resolution. Here, two taxa (eukaryotes and prokaryotes, respectively indicated by mitochondrial *COI* gene and 16S rRNA gene) were identified and analyzed. Results showed that in the middle reach of Yangtze River, the prokaryotic WBIF transport capacity was 99.91%/km, the WBIF labeling nonliving prokaryotic materials accounted for 23.83% of the total prokaryotic WBIF and had a half-life distance of 48.45 km; the eukaryotic WBIF transport capacity was 99.85%/km, the WBIF labeling nonliving eukaryotic materials accounted for 67.93% of the total eukaryotic WBIF and had a half-life distance of 30.00 km. There was tradeoff between the reliability and coverage of eDNA monitoring spatial resolution. The reliability and coverage of prokaryotic eDNA monitoring spatial resolution got their balance point at 39 km with the value approximate 86%. The reliability and coverage of eukaryotic eDNA monitoring spatial resolution got their balance point at 28 km with the value approximate 65%. To adapt different monitoring aims, one could select different eDNA monitoring spatial resolutions based on a suitable reliability or coverage. To identify the species composition of a unit reach, one should give priority to the coverage of eDNA monitoring spatial resolution. 90% prokaryotic coverage needs a spatial resolution of 27 km (reliability, 84.18%); 90% eukaryotic coverage needs a spatial resolution of 6 km (reliability, 41.38%); 80% eukaryotic

本文系中央级公益性科研院所基本科研业务费专项（YFI202201）资助的研究成果。

coverage needs a spatial resolution of 13 km (reliability, 50.64%). To identify the species spatial heterogeneity of a set of adjacent reaches, one should give priority to the reliability of eDNA monitoring spatial resolution. 90% prokaryotic reliability needs a spatial resolution of 58 km (coverage, 82.30%); 90% eukaryotic reliability needs a spatial resolution of 78 km (coverage, 38.61%); 80% eukaryotic reliability needs a spatial resolution of 50 km (coverage, 49.70%). As the pilot study of eDNA monitoring spatial resolution in middle Yangtze River, the current results were not accuracy enough, because of the spatial and temporal heterogeneous WBIF along the river, the systemic errors of random sample. The current work could provide a quantitative reference for the eDNA monitoring sampling setting in the middle reach of Yangtze River and provide a methodology reference for the eDNA monitoring spatial resolution estimating in other free flowing rivers and reaches.
Keywords: The middle reach of Yangtze River; environmental DNA monitoring; spatial resolution; reliability; coverage; watershed biological information flow; watershed ecology

eDNA 监测有助于保障长江水生生物保护和十年禁渔工作的适应性管理。为应对和解决长江生态环境退化、水生生物资源衰减和物种丧失等问题[1, 2]，国家提出长江大保护战略[3]，加强长江水生生物保护工作[4]，实施长江重点水域全面禁捕[5, 6]，施行《中华人民共和国长江保护法》[7]。为保障长江水生生物保护和十年禁捕工作的适应性管理，需要水生生物资源及生态环境状况的监测评估[8]，尤其是具有前瞻性系统性的长江水生态环境状况监测评估。eDNA 监测，从水体、沉积物、土壤、混合物等环境样品中直接提取 DNA，利用宏条形码和高通量测序技术对其进行定性或定量分析，高效率地实现非接触、无损伤的多物种（或高级分类单元）监测[9-14]。水生动物共生微生物影响着宿主的健康[15]，同时又受环境微生物的显著影响[16]，对环境微生物的 eDNA 监测既可以评估水体微生态健康状况，又可以预警水生动物健康状况[15, 16]。为了保障长江水生生物保护和十年禁捕工作的适应性管理，eDNA 监测将是未来水生生物监测的一大趋势和需求[10]。

eDNA 监测的空间分辨率未量化阻碍了其在水生生物常态化监测评估中的应用。二代测序和 DNA (meta)barcoding 技术的成熟提高了 eDNA 监测技术可用性[17]。因为 eDNA 监测结果受各种因素影响[18]，为了夯实 eDNA 监测结果的有效性、可比性，亟需 eDNA 监测的规范化、标准化[19]。eDNA 监测技术流程有 10 个关键环节：平行样设计、采样点设计、采样时间设计、采样方法控制、样品处理方法、样品保存方法、扩增测序引物选择、样品提取-扩增-测序-分析程序、序列比对注释、监测结果后评估[10]。其中 eDNA 监测采样点设计（即样点空间间隔最优设置距离，一个样点的 eDNA 监测结果所能反映水生生物组成特征的江段长度，其关键是 eDNA 监测空间分辨率的量化）问题尚未得到便捷有效的量化，无法回答用 eDNA 监测结果判断监测水域生物物种存在与否的假阳性问题[20]，已成为阻碍 eDNA 监测在水生生物常态化监测评估中应用的关键因素之一。

eDNA 监测的空间分辨率量化可通过 eDNA 随径流输移量化特征的黑箱计算来进行。eDNA 监测空间分辨率是指 eDNA 监测结果对 eDNA 释放源的空间分布的辨识能力，可以量化描述为在特定可信度条件下，eDNA 监测结果所能对 eDNA 释放源的空间分布进行辨识的最小空间单元。eDNA 是不同状态 DNA（有溶解态、颗粒吸附态、胞内态、细胞器内态等）的混合物[21]，在河流水体环境中存在一定的持留时间，并受径流驱动发生一定的空间迁移[11, 22, 23]。eDNA 随径流的输移，受 eDNA 的降解速率以及由径流驱动的运输、吸附与沉积、再悬浮等过程影响[24, 25]，其中 eDNA 的降解速率受来源（生物类群）、形式（胞内胞外）、初始浓度、赋存介质（溶解于水或吸附于颗粒物）、环境温度、BOD、营养盐组成及浓度、pH、紫外线、叶绿素、环境微生物等因素影响[9, 26, 27]。通过各环境因子的参数化、对 eDNA 输移降解过程的模型化[28]来实现 eDNA 监测空间分辨率的量化，短期内面临较大困难和不确定性[21, 29]。为了解决当前实践中无量化方法可用的问题，可以采取权宜之计，把 eDNA 产生、输移、降解等的复杂生态学过程打包成黑箱，接受不确定性、控制不确定性、量化不确定性，基于流域生物信息流分析框架，对 eDNA 随径流输移有效距离进行统计性量化[10]，然后计算满足一定 eDNA 监测检出可信度（实际应用中或需兼顾考虑 eDNA 检出覆盖度）的最短 eDNA 输移距离，来概率性量化 eDNA 监测的空间分辨率。流域生物信息流分析框架，主要根据 eDNA 的指数级衰减特性[30, 31]，用 eDNA（物种或 OTUs 种类）随径流输移的输移能力、非生命体信息占比、非生命体信息输移半衰距离来描述流水系统中 eDNA 随径流输移的量化特征[32]。

在长江中游江段开展 eDNA 监测的空间分辨率量化研究具有重要性和示范性。长江中游（葛洲坝下至湖口）江段连通洞庭湖、汉江、鄱阳湖等重要支流，是长江极为重要的自由流淌河段，为中华鲟、长江江豚等水生生物提供了关键生境。量化长江中游 eDNA 监测空间分辨率可推进长江中游常态化、系统性 eDNA 监测及监测数据的标准化积累，也可为其它自由流淌河流和江段的 eDNA 监测空间分辨率量化提供方法借鉴。本研究 2020 年 6 月（平水期）在长江中游设置 30 个采样断面，相邻采样断面间的径流距离为 30 km 左右，自下而上（从湖口到宜昌）开展 eDNA 采样，针对原核生物（16S rRNA 基因）、真核生物（线粒体 *COI* 基因）进行高通量测序检测，然后根据流域生物信息流分析框架计算 eDNA 输移的量化特征，确定 eDNA 监测空间分辨率（系列）值的可信度和覆盖度。基于案例研究，本文着重探讨基于流域生物信息流分析框架的 eDNA 监测空间分辨率研究的基本路径、基本方法、基本假设及相应局限性和影响因素，期待

能为未来的相关研究提供参考。

1 研究区域与方法

1.1 eDNA 样品采集

在长江中游设置 30 个采样断面（如图 1），相邻采样断面间的径流距离为 30 km 左右（如表 1）。2020 年 6 月 14 日至 29 日（平水期）期间，乘船（自下而上）在江中间按照采样断面用无菌采样瓶采取 1~3m 水深处的水样，采样过程中先用所采水层水样涮洗采样瓶 3 次，然后封装水样 1.5 L。采样期间，水温在 23~26℃之间，水位在 22.3~24.8 m 之间，流量在 28600~44000 m³ /s（水位和流量参考汉口水文站）之间，且水位、流量呈持续上涨态势。

所采集的水样封装好之后放入冰浴泡沫箱保低温，带回实验室用 0.2 μm 孔径滤膜进行抽滤（采样后 12 h 内处理完毕，抽滤前水样摇匀），抽滤过程中根据水样中相关颗粒物浓度（堵塞滤膜的时间）来控制更换滤膜时机，获得存留了 eDNA 的滤膜（每份水样使用了 2~3 张滤膜），放入 50 mL 无菌离心管，用自封袋装好，置于泡沫箱干冰浴运输，–80 ℃冰箱保存。

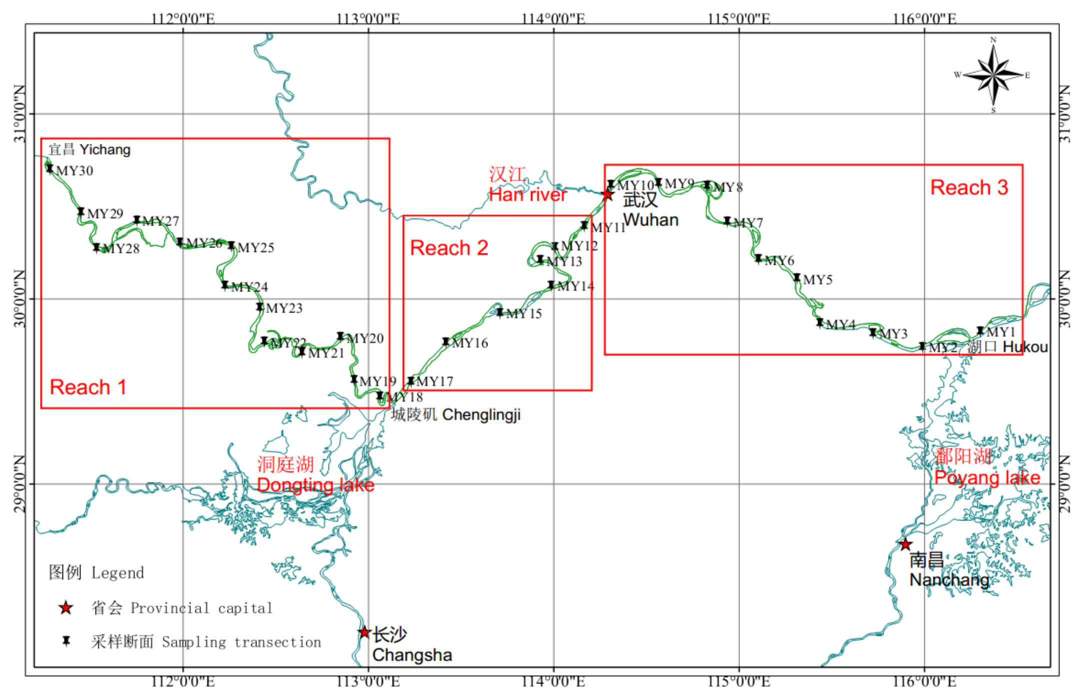


图 1 长江中游采样断面设置示意图

Figure 1 Locations of 30 sampling transections in the middle reach of Yangtze River

表 1 长江中游相邻采样断面间的径流距离

Table 1 The runoff distances between adjacent sampling transections in the middle reach of Yangtze River

区段编号 Reaches	断面区间 Adjacent sampling transections	相邻断面间径流距离/km Distances between adjacent sampling transections /km
Reach1	MY30-MY29	29.73
(MY30-MY18)	MY29-MY28	30.62
从宜昌断面到洞庭湖出湖口上游断面	MY28-MY27	29.67
From the transection at Yichang to the upstream adjacent	MY27-MY26	29.78

transection of the Dongting lake outlet	MY26-MY25	29.87
	MY25-MY24	28.70
	MY24-MY23	27.48
	MY23-MY22	29.70
	MY22-MY21	28.61
	MY21-MY20	29.73
	MY20-MY19	31.26
	MY19-MY18	29.62
	MY18-MY17	32.80
Reach2 (MY17-MY11) 从洞庭湖出湖口下游断面到汉江交汇口上游断面 From the downstream adjacent transection of the Dongting lake outlet to the upstream adjacent transection of the Han river outlet	MY17-MY16	29.82
	MY16-MY15	35.08
	MY15-MY14	32.66
	MY14-MY13	31.24
	MY13-MY12	29.27
	MY12-MY11	30.04
	MY11-MY10	29.11
Reach3 (MY10-MY1) 从汉江交汇口下游断面到鄱阳湖出湖口断面 From the downstream adjacent transection of the Han river outlet to the transection at Poyang lake outlet	MY10-MY9	28.41
	MY9-MY8	30.19
	MY8-MY7	30.20
	MY7-MY6	33.14
	MY6-MY5	25.14
	MY5-MY4	30.09
	MY4-MY3	29.97
	MY3-MY2	30.13
	MY2-MY1	33.15

注：逆流而上进行样品采集，采样断面进行逆流顺序编号

Note: Samples were collected upstream, and the sampling transections were numbered upstream from Hukou to Yichang

1.2 eDNA 测序与序列分析

用试剂盒[DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN, Germany)]按照操作规范流程对留存 eDNA 的滤膜进行处理，提取 eDNA（通常选用一张滤膜，剩余的为备用，根据需要可进行重新提取）。针对真核生物用线粒体 *COI* 基因的宏条形码引物 mlCOIintF (5’-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC) / jgHCO2198R (5’-TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA)进行 PCR 扩增（片段长度 320 bp 左右），针对原核生物用 16S rRNA 基因的宏条形码引物 338F (5’-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3’) / 806R (5’-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3’) 进行 PCR 扩增（片段长度 410 bp 左右）[33]。为保证后续数据分析的准确性及可靠性，需要尽可能使用低循环数扩增，并保证每个样本扩增的循环数一致，因此通过预实验确定 PCR 的循环数，确保在最低循环数中使绝大多数样本能够扩增出浓度合适的产物。PCR 反应体系为：$5\times$TransStart FastPfu 缓冲液 4 μL，2.5 mmol/L dNTPs 2 μL，上游引物(5 μmol/L) 0.8 μL，下游引物(5 μmol/L) 0.8 μL，TransStart FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μL，BSA 0.2 μL，模板 DNA 10 ng，ddH_2O 补足至 20 μL。mlCOIintF/ jgHCO2198R 的 PCR 扩增程序如下: 95 ℃ 预变性 5 min，35 个循环(95 ℃ 变性 60 s，47 ℃ 退火 120 s，72 ℃ 延伸 60 s)，然后 72 ℃ 稳定延伸 5 min，最后在 10 ℃进行保存(PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型)。338F/ 806R 的 PCR 扩增程序如下: 95 ℃ 预变性 3 min，25 个循环(95 ℃ 变性 30 s，55 ℃ 退火 30 s，

72 ℃ 延伸 45 s)，然后 72 ℃ 稳定延伸 10 min，最后在 10 ℃进行保存(PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型)。每个样本 3 个重复，将同一样本的 PCR 产物混合后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测，使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒（AXYGEN 公司）切胶回收 PCR 产物，Tris_HCl 洗脱；2%琼脂糖电泳检测，参照电泳初步定量结果，将 PCR 产物用 QuantiFluor™ -ST 蓝色荧光定量系统（Promega 公司）进行检测定量；按照每个样本的测序量要求（平均 4 千万 bp 数据量），进行相应比例的混合；通过 PCR（TruSeqTM DNA Sample Prep Kit）将 Illumina 官方接头序列添加至目标区域外端，使用凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物，Tris-HCl 缓冲液洗脱，2%琼脂糖电泳检测，氢氧化钠变性，产生单链 DNA 片段，建立 DNA 文库；在 Illumina Miseq 平台上机测序，获得 DNA 序列数据(委托上海美吉生物医药科技有限公司)。相关序列原始数据已存于国家基因库生命大数据平台（China National GeneBank DataBase, CNGBdb, https://db.cngb.org/）的长江中游 eDNA 序列文件夹中（项目编号: CNP0002410，DOI: 10.26036/CNP0002410）。

测序所得的序列结果在美吉生物云平台(www.majorbio.com)上进行质控、拼接(用 FLASH version 1.2.11 https://ccb.jhu.edu/software/FLASH/index.shtml) 、 OTU 聚类(用 UPARSE version 7.0.1090 http://drive5.com/uparse/，线粒体 *COI* 基因序列用 99%的序列相似度，16S rRNA 基因序列用 97%的序列相似度)、物种注释(采用 RDP classifier 贝叶斯算法 version 2.11 https://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/，线粒体 *COI* 基因序列比对 NCBI 核酸序列数据库 nt_v20200604，取 90%的分类置信度，16S rRNA 基因序列比对 silva138/16s_bacteria 数据库，取 70%的分类置信度)，获得每份样品所监测到的物种组成及其相对丰度。统计各采样断面用线粒体 *COI* 基因序列所检出的真核生物（eukaryotes）物种组成和用 16S rRNA 基因序列所检出的原核生物（bacteria）物种组成。

1.3 流域生物信息流分析

流域生物信息流是生物信息依托于流域生态系统过程在不同空间和系统之间进行传递、交流、作用、反馈的路径、过程与控制[32]。流域生物信息流分析框架有五个基本设定：1）流域（进行生物信息传递的空间）可被构建为一个包含了一系列子系统的集合生态系统[34]；2）各子系统在特定时段内具有相对确定的群落组成且有相对稳定的生物信息释放[35]；3）流域生物信息流载体包括非生命个体（即不具生命活性的生物指征物质，如 eDNA、甾醇等，随输移过程而衰减）和生命个体（即具有生命活性的生物物质，如可采样鉴定计数的微生物、可现场识别计数的生物，不随输移过程而衰减）[32]；4）流域生物信息流输移包括由上游到下游的正向输移、由下游到上游的逆向输移、上下游共有物种的配平（假）输移[32]；5）流域生物信息流过程简化后由输移效率、输移能力、非生命个体生物信息占比、非生命个体生物信息输移半衰距离、环境过滤效应等几个统计指标来量化[32]。上下游共有但并无空间迁移的生物信息的配平（假）输移在计算中合并入生命个体所承载的生物信息输移项内，不影响非生命个体生物物质所承载的生物信息的输移计算，不影响 eDNA 监测结果的空间分辨率量化和判断。

根据流域生物信息流分析框架，建立一条从宜昌（MY30）到湖口（MY1）的生物信息输移链，考虑到该输移链中不存在显著的水环境条件的切变，以及在生物信息输移过程中存在洞庭湖（MY18/MY17）、汉江（MY11/MY10）的汇流（图 1，表 1），所以将流域生物信息流计算公式[32, 33]略做调整，如下：

$$e = \frac{Num(\mathrm{S} \cap \mathrm{P})}{Num(\mathrm{S})} \qquad \text{（公式 1）}$$

$$e = t^{d} \times (1 - l) \times \left[(1 - k) + k \times \left(\frac{1}{2}\right)^{\left(\frac{d}{D}\right)} \right] \qquad \text{（公式 2）}$$

式中，*e* 指流域生物信息流的累计输移效率，*Num*(S∩P)指源-汇（上下游样点）共有的物种数，*Num*(S)指源（上游样点）的物种数，*t* 指径流对生物信息在单位距离内的输移能力（设定其在确定环境条件下为常数），*l* 指在发生径流汇入时产生的稀释效应（设定其在确定径流条件下为常数），*k* 指所有生物信息载体中非生命个体的生物信息的占比（设定其在确定环境条件下为常数），*d* 指输移距离，*D* 指非生命个体的生物信息随径流输移的半衰距离（设定其在确定环境条件下为常数）。

考虑到采样的随机性可能会对流域生物信息流估算产生影响，对相邻采样断面间流域生物信息流和径流距离进行分析。考虑到样品检出物种数量的差异可能会对流域生物信息流估算产生影响，对相邻采样断面间流域生物信息流和检出物种数比值进行分析。考虑到汇流对水温、水文的可能影响会进一步影响到水体中生物信息的输移过程，对 MY30~MY18 (Reach 1)，MY17~MY11 (Reach 2)，MY10~MY1 (Reach 3)再分别建立生物信息输移链（图 1，表 1），计算分段的流域生物信息流量化特征。所有输移链的流域生物信息流量化特征计算基于一系列流域生物信息流输移效率 *e* 和输移距离 *d* 的数据对，并参照文献进行[32, 33]。由于流域生物信息流受众多因素影响所导致的复杂性，公式 2 无法通过严格的公式求得解析解，因而选择在 Microsoft Excel 中利用演化算法对公式 2 进行基于演化算法的规划求解[32, 33]。计算以随机数为各待求解参数（*t*、*k*、*D*、*l*）的初始值，进行 30 次规划求解计算获得各参数的近似解，对所得参数近似解进行统

计（CI=95%）获得最终近似解[32, 33]。

1.4 eDNA 监测空间分辨率估算

eDNA 监测空间分辨率是 eDNA 监测结果对 eDNA 释放源的空间分布的辨识能力。在 eDNA 监测结果对 eDNA 释放源的空间分布的反映满足特定可信度条件下，eDNA 监测结果所能对 eDNA 释放源的空间分布进行辨识的最小空间单元，即为 eDNA 监测空间分辨率。可以用满足一定 eDNA 监测检出可信度（实际应用中或需兼顾考虑 eDNA 检出覆盖度）的最短生物信息输移距离来作为 eDNA 监测空间分辨率的定量。因此 eDNA 监测空间分辨率估算的核心就是对生物信息输移距离所对应可信度和覆盖度的估算——可信度，即避免两个采样点监测到的是同一个信号源的概率，用 1 减去分辨率网格边界距离的非生命个体生物信息的输移效率来表示（公式 3）；覆盖度，即避免监测区域内 eDNA 释放源检出出现遗漏的概率，用分辨率网格距离内的全生物信息流输移效率来表示（公式 4）[10]。分别针对真核生物和原核生物计算在一定 eDNA 监测空间分辨率下的可信度和覆盖度，计算中，各参数采用流域生物信息流分析所获得的近似解的平均值。

$$r = 1 - t^d \times k \times \left(\frac{1}{2}\right)^{\left(\frac{d}{D}\right)} \qquad \text{（公式 3）}$$

$$c = t^d \times \left[(1-k) + k \times \left(\frac{1}{2}\right)^{\left(\frac{d}{D}\right)}\right] \qquad \text{（公式 4）}$$

式中，r 指 eDNA 监测空间分辨率的可信度，c 指 eDNA 监测空间分辨率的覆盖度，t 指径流对生物信息在单位距离内的输移能力（设定其在确定环境条件下为常数），k 指所有生物信息载体中非生命个体生物信息的占比（设定其在确定环境条件下为常数），d 指输移距离，D 指非生命个体生物信息随径流输移的半衰距离（设定其在确定环境条件下为常数）。

2 结果

2.1 采样断面的物种检出

30 个采样断面共获得真核生物（线粒体 *COI* 基因测序结果）有效序列 3779192 条，聚类获得 11211 个 OTU，通过物种分类学注释检出 4 界，40 门，148 纲，450 目，1422 科，2829 属，4403 种；共获得原核生物（16S rRNA 基因测序结果）有效序列 2631390 条，聚类获得 8552 个 OTU，通过物种分类学注释检出 1 界，59 门，179 纲，423 目，713 科，1593 属，3426 种（图 2）。从整体上来看，每个断面样品中检出的真核生物和原核生物物种数均存在一定的样品间差异；从空间上来看，每个断面样品中检出的真核生物和原核生物物种数均沿着河流向下逐渐减少（图 2）。

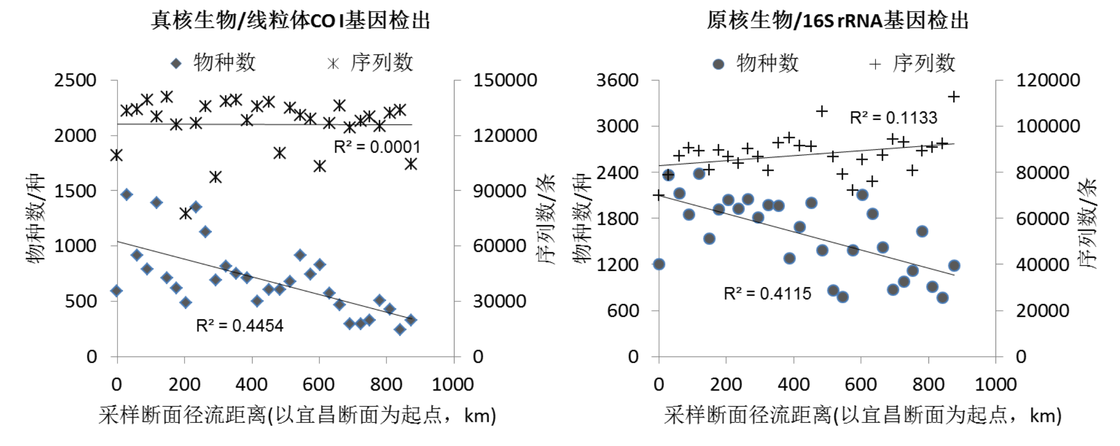


图 2 各采样断面样品测得的真核生物和原核生物序列数，检出的真核生物和原核生物物种数

Figure 2 Sequenced eukaryotic and prokaryotic sequence numbers and detected eukaryotic and prokaryotic species numbers from the sample of each sampling transection

2.2 断面间的流域生物信息流

相邻断面间径流距离为 25.14~35.08 km，真核生物的 eDNA 输移效率为 32.47%~70.72%，原核生物的 eDNA 输移效率为 47.21%~91.79%。整体来看，不同相邻断面间的 eDNA 输移效率存在一定的差异，但基

本稳定在一定范围（图 3）。相邻断面间上游采样断面样品检出物种数对下游采样断面样品检出物种数的比值，真核生物的为 0.36~1.95，原核生物的为 0.51~1.80。整体来看，不同相邻断面间的 eDNA 输移效率与上下游采样断面样品检出物种数比值负相关（图 3）。

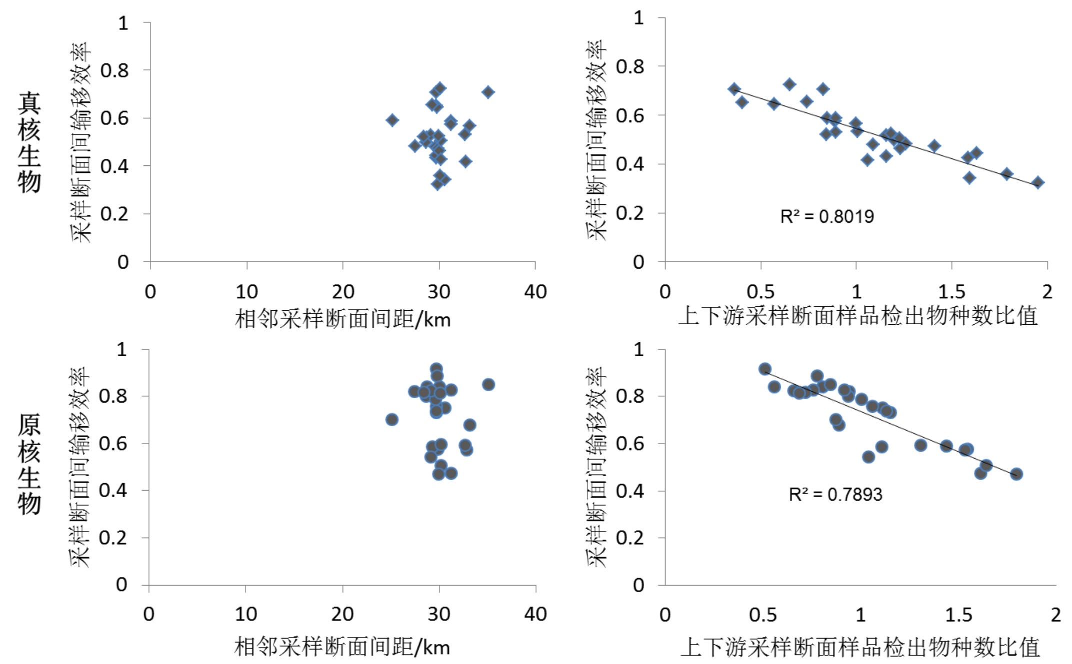


图 3 各采样断面间流域生物信息流输移效率及其与上下游采样断面样品检出物种数比值的关系

Figure 3 The watershed biological information flow (WBIF) transportation effectiveness between adjacent sampling transections and its relationship with the ratio of adjacent up sampling transection detected species number to adjacent down sampling transection detected species number

2.3 输移链的流域生物信息流

以宜昌断面为起点顺流而下至到湖口断面的 eDNA 输移链流域生物信息流，真核生物的累计输移效率在前 200 km 左右江段的输移过程中快速下降，后面呈现出具有微弱分段性特征的长尾状态，原核生物的累计输移效率在前 150 km 左右江段的输移过程中快速下降，后面呈现出具有明显分段性特征的长尾状态（图 4）。分别以宜昌、城陵矶、汉口断面为起点顺流而下的 3 段 eDNA 输移链流域生物信息流，真核生物的累计输移效率呈现出彼此类似的曲线结构，原核生物的累计输移效率呈现出彼此具有显著差异的曲线结构（图 4），计算所得特征值也存在一定的差异（表 2）。

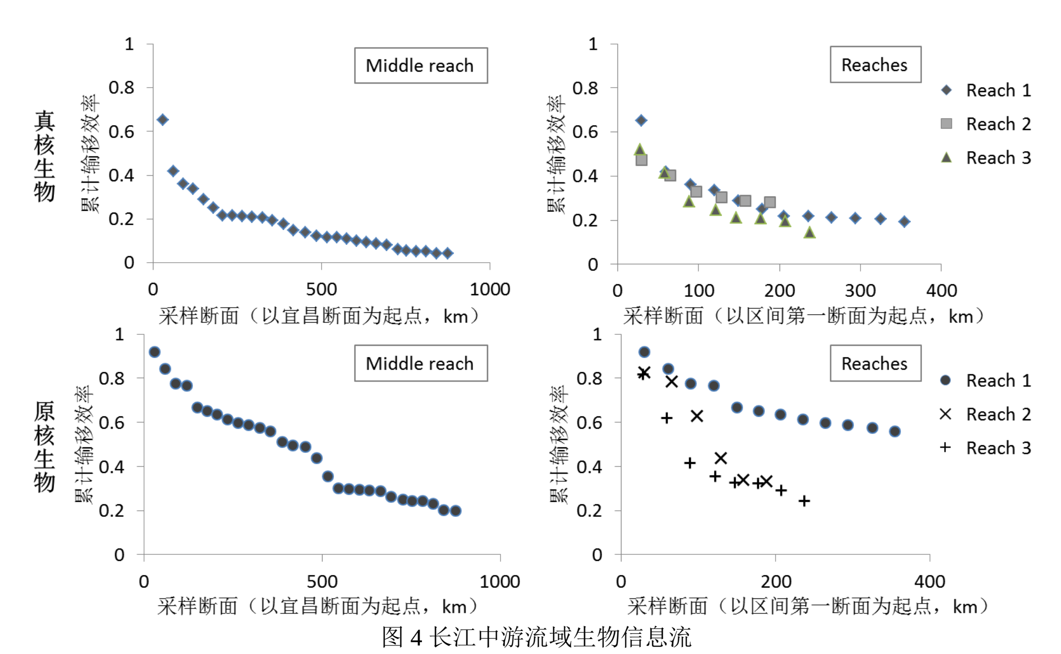


图 4 长江中游流域生物信息流

Figure 4 The watershed biological information flow (WBIF) transportation effectiveness in the middle reach of Yangtze River

Middle reach 指从宜昌断面到湖口断面（MY30-MY1）；Reach 1 指从宜昌断面到洞庭湖汇入口上游断面（MY30-MY18），Reach 2 指从洞庭湖汇入口下游断面到汉江汇入口上游断面（MY17-MY11），Reach 3 指从汉江汇入口下游断面到湖口断面（MY10-MY1）

Middle reach, from Yichang transection to Hukou transection (MY30-MY1); Reach 1, from Yichang transection to the upstream adjacent transection of Dongting lake outlet (MY30-MY18); Reach 2, from the downstream adjacent transection of Dongting lake outlet to the upstream adjacent transection of Han river outlet (MY17-MY11); Reach 3, from the downstream adjacent transection of Han river outlet to Hukou transection (MY10-MY1)

表 2 长江中游流域生物信息流量化特征

Table 2 The quantitative characteristics of the watershed biological information flow (WBIF) in the middle reach of Yangtze River

		输移效率 (/km)	输移能力 (/km)	非生命体信息占比	非生命个体生物信息半衰距离(km)	洞庭汇流稀释效应	汉江汇流稀释效应
真核生物	M	98.30%±0.01%	99.85%±0.01%	67.93%±1.47%	30.00±1.31	0	0
	R1	98.31%±0.02%	99.83%±0.02%	66.30%±2.31%	29.84±1.76		
	R2	95.92%±0.08%	99.66%±0.08%	55.22%±2.27%	9.86±0.92		
	R3	97.33%±0.02%	99.69%±0.02%	64.02%±1.17%	18.41±0.54		
原核生物	M	99.57%±0.01%	99.91%±0.01%	23.83%±2.72%	48.45±6.30	0.63%±0.62%	0
	R1	99.62%±0.01%	99.90%±0.01%	23.18%±2.71%	55.92±5.74		
	R2	98.91%±0.03%	99.55%±0.03%	23.53%±3.45%	24.66±4.13		
	R3	98.98%±0.01%	99.51%±0.01%	30.39%±0.66%	39.10±1.64		

注：M 指从宜昌断面到湖口断面（MY30-MY1）；R1 指从宜昌断面到洞庭湖汇入口上游断面（MY30-MY18），R2 指从洞庭湖汇入口下游断面到汉江汇入口上游断面（MY17-MY11），R3 指从汉江汇入口下游断面到湖口断面（MY10-MY1）

Note: M, from Yichang transection to Hukou transection (MY30-MY1); R1, from Yichang transection to the upstream adjacent transection of Dongting lake outlet (MY30-MY18); R2, from the downstream adjacent

transection of Dongting lake outlet to the upstream adjacent transection of Han river outlet (MY17-MY11); R3, from the downstream adjacent transection of Han river outlet to Hukou transection (MY10-MY1)

2.4 eDNA 监测空间分辨率

eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度之间存在权衡（图 5）。真核生物的 eDNA 监测空间分辨率可信度与覆盖度平衡点在 28 km 左右，特征值在 65%左右；原核生物的 eDNA 监测空间分辨率可信度与覆盖度平衡点在 39 km 左右，特征值在 86%左右（表 3）。eDNA 监测空间分辨率可信度与覆盖度的阈值根据需要可取 80%或 90%（表 3）。

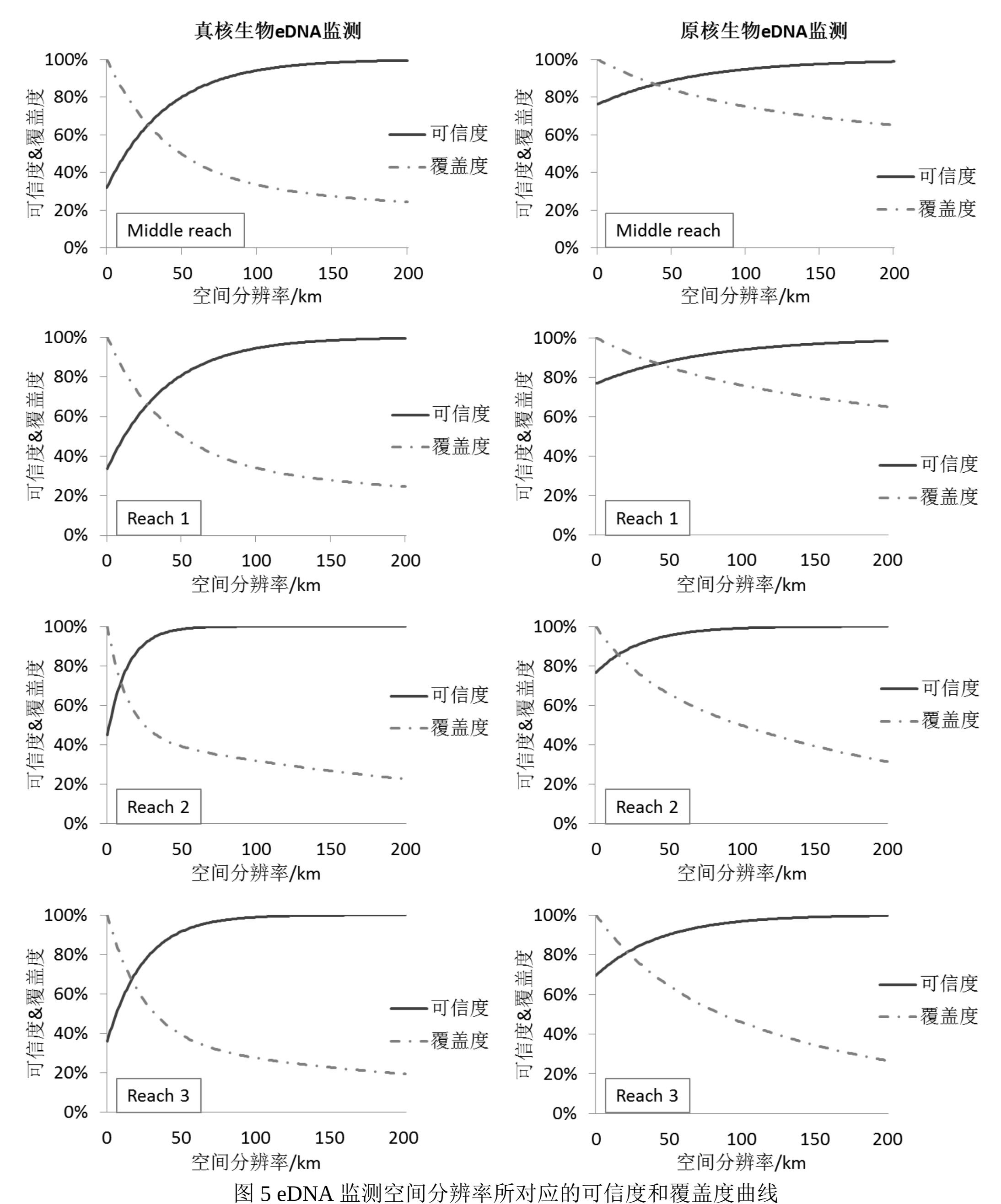


图 5 eDNA 监测空间分辨率所对应的可信度和覆盖度曲线

Figure 5 The curves of the reliability and coverage of eDNA monitoring spatial resolution

Middle reach 指从宜昌断面到湖口断面（MY30-MY1）；Reach 1 指从宜昌断面到洞庭湖汇入口上游断面

（MY30-MY18），Reach 2 指从洞庭湖汇入口下游断面到汉江汇入口上游断面（MY17-MY11），Reach 3 指从汉江汇入口下游断面到湖口断面（MY10-MY1）。可信度，本次监测到的生物信息种类排除来自于本空间分辨率网格外的概率；覆盖度，本空间分辨率网格内的生物信息种类被本次监测到的比例。
Middle reach, from Yichang transection to Hukou transection (MY30-MY1); Reach 1, from Yichang transection to the upstream adjacent transection of Dongting lake outlet (MY30-MY18); Reach 2, from the downstream adjacent transection of Dongting lake outlet to the upstream adjacent transection of Han river outlet (MY17-MY11); Reach 3, from the downstream adjacent transection of Han river outlet to Hukou transection (MY10-MY1). Reliability of eDNA monitoring spatial resolution indicates the probability of excluding the adjacent up spatial resolution unit biological information types (such as species) from the monitoring of the current spatial resolution unit; coverage of eDNA monitoring spatial resolution indicates the probability of detecting all the biological information types (such as species) of the current spatial resolution unit

表 3 不同可信度和覆盖度目标下的 eDNA 监测空间分辨率（中游江段）
Table 3 The eDNA monitoring spatial resolution of adapting to several definite reliability and coverage goals in the middle reach of Yangtze river

空间分辨率/km	原核生物		真核生物	
	可信度†	覆盖度‡	可信度†	覆盖度‡
6	78.24%	97.53%	41.38%	**90.41%**
13	80.44%	94.87%	50.64%	**80.83%**
27	84.18%	**90.22%**	65.00%	65.83%
28	84.42%	89.91%	**65.85%**	**64.93%**
39	**86.82%**	**86.81%**	73.94%	56.36%
50	88.84%	84.08%	**80.11%**	49.70%
58	**90.12%**	82.30%	83.66%	45.81%
78	92.71%	78.46%	**90.00%**	38.61%

† 可信度：本次监测到的生物信息种类排除来自于本空间分辨率网格外的概率

‡ 覆盖度：本空间分辨率网格内的生物信息种类被本次监测到的比例

下划线和加粗用以标注可信度与覆盖度达到平衡，或临界达到 80%、90%的可信度与覆盖度值

† Reliability of eDNA monitoring spatial resolution indicates the probability of excluding the adjacent up spatial resolution unit biological information types (such as species) from the monitoring of the current spatial resolution unit

‡ Coverage of eDNA monitoring spatial resolution indicates the probability of detecting all the biological information types (such as species) of the current spatial resolution unit

Underline and bold fonts are used to indicate the conditions that reliability and coverage get equilibrium, or reliability or coverage just gets the threshold value of 80% or 90%

3 讨论

3.1 本研究结果的局限性说明

本研究结果存在三方面的局限性：1）只在真核生物和原核生物这两个大类群层面上进行了分析，没有对更细分层面上的类群进行细分分析，相关结果是大类群层面上的统计性结果，各相关细分类群可以参考和引用本整体性结果，但需审慎并进行针对性评估；2）由于从上游到下游 eDNA 采样的抽样相对强度的趋势性降低，从上游到下游 eDNA 的物种检出度存在趋势性降低，可能导致流域生物信息流输移效率估值系统性偏低，eDNA 监测空间分辨率的可信度估值偏高、覆盖度估值偏低；3）eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度在不同的尺度、不同江段有不同的统计量特征，并受径流、水温等的影响，同时也与 eDNA 监测目标片段类型及大小、监测技术等相关，本结果只供 eDNA 监测开始前的监测断面设置时参考，监测结果的空间定量解释应根据具体监测结果进行计算获得。

3.2 针对细分类群进行 eDNA 监测空间分辨率评估中的问题

理想情况下应该对各细分类群分别进行流域生物信息流计算，评估其各自的 eDNA 监测空间分辨率。eDNA 监测只关注该监测到的信号是否被遗漏掉，不该监测到的信号是否被监测到，所以进行 eDNA 监测空间分辨率评估，就是在空间上进行 eDNA 可检出和不可检出间的限度进行评估。eDNA 的不可检出主要取决于两个层面的因素：1）eDNA 片段降解至短于监测扩增片段长度[36]，2）可检出 eDNA 片段的浓度降解或稀释至低于检出限[37]。eDNA 降解受初始片段长度、初始浓度、降解速率等的影响[38, 39]，而 eDNA 的释放形态和释放速率又存在较强的类群差异性[40]，进而造成不同类群的 eDNA 可监测距离的差异性[41-44]。因此，理想化来讲，eDNA 监测空间分辨率评估，应该针对各细分类群分别进行评估。

针对大类群进行流域生物信息流计算和 eDNA 监测空间分辨率评估是低监测投入条件下避免偶然误差对结果产生过大影响的妥协选择。本研究中未能对长江中游 900 余 km 干流进行高密度、高强度、高重复采样，在其它绝大多数研究和监测工作中也会有类似的现实条件约束。eDNA 采样本身作为一个随机抽样过程，低样品重复数对水体断面内的物种检出度是比较有限的，比如在长江武汉段单 eDNA 样品的鱼类物种检出平均仅 26 种左右（9~39），检出度仅 26%左右[45]。因而低密度、低强度、低重复采样条件下，针对具体细分类群计算流域生物信息流、评估 eDNA 监测空间分辨率，就会出现可用的元素少、偶然误差大、统计结果不具有效性等问题。用大类群进行流域生物信息流计算、eDNA 监测空间分辨率评估可以获得数量相对较多的统计单元，进而降低抽样误差给计算带来的偶然误差，最终获得有效的统计结果，这是现实条件下的妥协。

以大类群进行 eDNA 监测空间分辨率评估具有一定的客观事实根据。本研究中流域生物信息流分析选用的是类群内所有物种，即真核生物是 *COI* 基因注释出来的所有 eukaryotes 门类下的物种，原核生物是 16S rRNA 基因注释出来的所有 bacteria 门类下的物种。一个青藏高原小流域的研究结果显示，原核生物（16S rRNA 基因所指示的）的非生命个体信息输移半衰距离比真核生物（线粒体 *COI* 基因所指示的）的大（17.82 km vs. 5.02 km）[33]，说明在 eDNA 监测空间分辨率评估中区分真核生物和原核生物是合适；微体真核生物（*ITS* 基因所指示的真菌）的非生命个体信息输移半衰距离比整体真核生物（线粒体 *COI* 基因所指示的包括了宏体生物和微体生物）的大，但大不了多少（5.96 km vs. 5.02 km）[33]，说明 eDNA 监测空间分辨率评估将真核生物作为一个整体具有一定的合理性。

本研究中 eDNA 监测空间分辨率相关特征的统计量化，依赖于 eDNA 随径流的可输移距离，有别于但不悖于传统针对特定物种的可监测距离量化。对具体真核生物物种的 eDNA 可监测距离的案例研究显示，可监测距离从小几十米[43, 44]，到几百米、数千米[41, 42]，再到上百千米[22]，变幅很大。Jo 等的整合分析显示，河流中，鱼类 eDNA 可监测距离小到 2.6 m，大到 13.2 km，中位数 154.1 m，平均值 217.6 m；估算显示，在 95%的目标 eDNA 颗粒完成沉降时，eDNA 可能已输移了 334.0~1272.7 m，在 99%的目标 eDNA 颗粒完成沉降时，eDNA 可能已输移了 513.5~1956.4 m；这个 eDNA 可输移距离与流量正相关，其流量范围为 0.001~2.500 m^3/s [23]。根据 Jo 等给出的 eDNA 可输移距离与流量之间的拟合关系式[23]，粗略估算长江中游（参考汉口水文站流量，28600~44000 m^3/s 间）的鱼类 eDNA 可监测输移距离 3~241 km，中间值在 25 km 左右，与本研究中所估算的真核生物 30 km 的非生命个体生物信息输移半衰距离相近（非生命个体生物信息输移半衰距离，宏体生物的 < 总体的 < 微体生物的）。但本研究采用流域生物信息流分析框架分析估算 eDNA 监测空间分辨率的相关量化特征，面对 eDNA 的生态学过程中难以控制的复杂性、偶然性，自始至终采用统计视角，不同于传统的针对特定物种进行具体量化和整合分析的方法，降低了研究的工作量、减少了计算的复杂度、提高了结果的量化水平。

3.3 eDNA 监测空间分辨率评估中的不确定性误差及其来源

eDNA 监测检出物种的随机性和水体体积自上而下的逐渐增大，导致了单次采样物种检出度的偶然性误差和趋势性降低。理论上来讲，上游对下游（以及岸带对水体）的流域生物信息流输入会增加下游的可检出生物多样性[46]，虽然考虑到 eDNA 的沉降和降解等情况[23]，这一增加是非累积的[32]，但通常下游的可检出生物多样性应该不比上游少。eDNA 监测从本质上来讲就是随机抽样过程，而 eDNA 在水体中并非均匀分布，所以单个样品中 eDNA 检出物种依然存在随机误差，并且随着采样水域水体体积的增大，水体中各物种的 eDNA 被单次采样采集到并检出的概率在减小。本研究结果中检出物种数的样品间差异和沿着河流向下逐渐减少的趋势（图 2）即是该情况的真实反映，增加样品重复数可以降低其偶然性误差和趋势性误差。

从宜昌（MY30）到湖口（MY1）各断面 eDNA 监测物种检出度的趋势性降低，导致了流域生物信息流估算的系统性偏低，进而导致 eDNA 监测空间分辨率的可信度估值系统性偏高、覆盖度估值系统性偏低。模拟研究显示，断面生物信息检出度影响了流域生物信息流估算的准确度和精密度，随着检出度的增大，流域生物信息流估算结果会从偏小逐渐靠近流域生物信息流实际值，同时其 99.9%置信区间也逐渐集中于流域生物信息流实际值[35]，可推出当前的流域生物信息流输移效率估值大概率上是偏低的。研究显示，相

邻断面间的 eDNA 输移效率与上下游采样断面样品检出物种数比值负相关（图 3），下游样点物种检出数越低，eDNA 输移效率估值越小，本研究中物种检出度（检出数）存在沿着河流向下逐渐减少的系统性误差（图 2），可推出本研究的 eDNA 输移效率估值存在系统性偏小。根据 eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度计算公式（公式 3，公式 4）可知，eDNA 输移效率估值的系统性偏小导致 eDNA 监测空间分辨率的可信度估值系统性偏高、覆盖度估值系统性偏低，进而导致 eDNA 监测空间分辨率选择会出现系统性偏小。

eDNA 监测 OTU 聚类相似度、物种注释参数设置的差异，会对流域生物信息流估算产生系统性影响，进而对 eDNA 监测空间分辨率的可信度、覆盖度产生系统性影响。在相对低的数值范围内，OTU 聚类相似度和物种注释分类置信度取值越高，获得的统计单元数（物种数）越多，流域生物信息流输移效率估算结果越低。有比较研究显示，物种水平和 OTU 水平的流域生物信息流相比（通常，OTU 水平的统计单元要比物种水平的统计单元要多要细分），OTU 水平的流域生物信息流输移效率估值更低、输移能力估值更低、非生命个体生物信息占比更高、非生命个体生物信息输移半衰距离更小[33]。根据 eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度公式（公式 3，4）可知，更低的流域生物信息流输移效率估值、更低的输移能力估值、更高的非生命个体生物信息占比、更小的非生命个体生物信息输移半衰距离，最终导致 eDNA 监测空间分辨率更大的可信度和更小的覆盖度，进而导致在 eDNA 监测方案设置中选择更小的 eDNA 监测空间分辨率。另外，由于测序平台在测序过程中存在一定的标签跳跃，会在测序结果中产生一些（假）稀有类群[47]，进而导致流域生物信息流输移效率估算结果偏低，eDNA 监测空间分辨率可信度偏大和覆盖度偏小。除了更换具有更高测序质量的测序平台[47]以外，通过降噪分析或低 OTU 聚类相似度、低分类置信度处理可以一定程度上降低其影响。

eDNA 的输移、沉降和降解不是均匀展开的，流域生物信息流不是空间均一的，eDNA 监测空间分辨率及其可信度、覆盖度也不会是固定常数。eDNA 输移依赖于由径流驱动的运输、吸附与沉积、再悬浮等过程[24-26, 48, 49]，以及随时随地的 eDNA 外源输入[32, 46]。eDNA 的降解受持留介质[50]、环境温度[51-53]、pH[53, 54]、紫外线[53]、营养盐组成和浓度[51, 55]、叶绿素[31]、环境微生物及胞外酶[36]等因素影响[26, 27]。在任何一个自然河流中，eDNA 的输移（输移能力）、eDNA 的组成（生命体的和非生命体的）、eDNA 的降解（非生命体信息半衰时间和半衰距离）、eDNA 的整体输移效率都不是连续的、一贯的、恒定的（图 4，表 2），相应 eDNA 监测空间分辨率及其可信度、覆盖度也不会是固定常数。但实践中不可能对其进行时空连续地随时随地地监测量化，也没必要对其进行时空连续地随时随地地监测量化。对其进行量化只是为了满足实践应用中的需求，通常只需要相对简化的统计量来描述即可。但在应用中需要时刻记得，所用的统计量结果只是一个统计概化的假象，而非事实本身（表 2）。

3.4 长江中游 eDNA 监测空间分辨率设置的建议

不同监测工作可以根据不同的工作目的和量化目标选择不同监测空间分辨率。比如，以弄清楚河段单元内究竟有哪些物种为目的的监测，需要确保尽可能多的单元内物种被监测到，即覆盖度尽可能高；以弄清楚两个相邻河段单元内物种组成有什么差异为目的的监测，需要确保尽可能少监测到来自相邻单元的物种，即可信度尽可能高；覆盖度和可信度的量化目标阈值，可以设置为 80%或 90%，甚或 95%、99%，根据具体条件和具体需求来定。虽然说以一个指标为主的时候可以牺牲另一个指标，但在条件合适的情况下还是推荐在满足一个指标要求的同时尽量也兼顾另一个指标（图 5）。比如，原核生物的可信度与覆盖度平衡点在 39km 的空间分辨率，特征值均在 86%左右，对于两个指标来讲都是可以接受的（>80%），那么在没有特别要求（更高的阈值）的情况下就可以以 39km 为空间分辨率设置 eDNA 监测采样断面；真核生物的可信度与覆盖度平衡点在 28km 的空间分辨率，特征值在 65%左右，对于两个指标来讲可能都是难以接受的（<80%），那么就需要在监测工作开始前确定工作目的，然后优先一个指标牺牲另一个指标（表 3）。在选定空间分辨率时，为了后续结果的准确度和精密度，可同时根据对应的覆盖度的值，在模拟计算中用覆盖度代替输移效率，以最优估值对实际值的偏离不超过 1%、估算值的 99.9%置信区间对实际值的最大偏离不超过 5%的标准选定相应的检出度目标，进而设置采样的重复数[35]。

本量化结果只供 eDNA 监测开始前进行监测断面设置时参考，监测结果的空间定量解释应根据具体监测结果进行分辨率计算获得。eDNA 输移和降解受多种环境因素影响[24-26, 48]，而这些因素又大多具有时空异质性，相对简化的统计量会因尺度的不同而不同（图 4，表 2），也会受径流、水温等的影响[33]而因河段的不同而不同、因时间的不同而不同。在整个长江中游开展 eDNA 监测，可参考长江中游 M 组的 eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度；假如只在长江中游某一小段开展 eDNA 监测，那么可参考长江中游 R1 或 R2 或 R3 组的 eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度；时间不同、径流不同、水温不同，相关量化特征也会有所差异，eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度也会有所差异。因为核基因片段在水环境中降解速率比线粒体基因片段在水环境中降解速率要快[52]，所以 eDNA 监测用核基因引物比用线粒体基因引物在同样 eDNA 监测空间分辨率条件下，监测结果可信度更大、但覆盖度更小。因为长片段 eDNA

会随着时间的推移逐渐降解为短片段 eDNA，大片段 eDNA 降解过程缓冲了小片段 eDNA 的降解，使得小片段的可监测时间和可监测距离更长[38, 39, 56]，所以 eDNA 监测所选用目标片段越小，在同样 eDNA 监测空间分辨率条件下，监测结果的可信度越小、覆盖度越大。监测样品抽滤过程中选用的滤膜孔径越大，收集到小片段 eDNA 的概率越小[57]，进而使得在同样 eDNA 监测空间分辨率条件下，监测结果的可信度越大、覆盖度越小。考虑到径流、水温、目标片段类型及大小、监测技术（采样方法-保存方法-处理方法-测序平台-分析参数）等可能对 eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度的影响，本研究的结果仅对具有类似环境条件下、方法条件下的研究具有比较可靠的参考性，但也仅作为 eDNA 监测断面设置时的参考。建议在参考时可以根据情况适当对数据预期进行调整，而对监测结果的空间定量解释则应根据具体监测结果进行相应的可信度和覆盖度评估。

4 结论

eDNA 监测空间分辨率是 eDNA 监测结果对 eDNA 释放源的空间分布的辨识能力，为了量化 eDNA 监测的空间分辨率，我们探索建立了一个基于黑箱模型、简化过程和概率化表述的量化方法，利用 eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度指标来对其进行概率化描述。eDNA 监测空间分辨率的可信度和覆盖度之间存在权衡。长江中游干流，水温在 23~26 ℃之间，水位在 22.30~24.79 m，流量在 28600~44000 m^3/s（水位和流量参考汉口水文站）时，39 km 左右的 eDNA 监测空间分辨率，对原核生物的 eDNA 监测（16S rRNA 基因，引物 338F/ 806R，410 bp 左右）可信度与覆盖度相对平衡，在 86%左右，基本满足两个指标的常规需求（>80%）；对真核生物的 eDNA 监测（线粒体 COI 基因，引物 mlCOIintF/ jgHCO2198R，320 bp 左右）可信度为 74%左右，覆盖度仅 56%左右，两个指标均不满足常规需求（>80%）；满足对真核生物 eDNA 监测的 80%可信度，eDNA 监测空间分辨率需要设置为 50 km 左右，满足对真核生物 eDNA 监测的 80%覆盖度，eDNA 监测空间分辨率需要设置为 13 km 左右。特别说明，本研究结果中可能存在 eDNA 监测空间分辨率的可信度估值系统性偏高、覆盖度估值系统性偏低，具体偏离程度尚未明确定量。本研究结果仅可作为 eDNA 监测断面设置时的参考，不宜直接作为其它监测工作结果的空间定量解释。

参考文献

[1] Cao WX. Several questions on the fish resources conservation in the Yangtze River. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*. 2008, **17**(02): 163-164.[曹文宣. 有关长江流域鱼类资源保护的几个问题. *长江流域资源与环境*. 2008, **17**(02): 163-164.]

[2] Zhang H, Jarić I, Roberts DL, *et al*.. Extinction of one of the world's largest freshwater fishes: Lessons for conserving the endangered Yangtze fauna. *Science of the Total Environment*. 2020, **710**: 136242. 10.1016/j.scitotenv.2019.136242

[3] 新华社. 新华时评："共抓大保护，不搞大开发"是历史责任. 新华网, 2016.01.07.

[4] 国务院办公厅. 《国务院办公厅关于加强长江水生生物保护工作的意见》[Z]. 国办发〔2018〕95号, 2018.

[5] 农业农村部. 《农业农村部关于长江流域重点水域禁捕范围和时间的通告》[Z]. 农业农村部通告（2019）4号, 2019.

[6] 农业部. 《农业部关于公布率先全面禁捕长江流域水生生物保护区名录的通告》[Z]. 农业部通告〔2017〕6号, 2017.

[7] 人大常委会. 《中华人民共和国长江保护法》[Z]. （2020年12月26日第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十四次会议通过）, 2020.

[8] 农业农村部新闻办公室. 农业农村部部署长江流域重点水域禁捕后水生生物资源监测和效果评估工作. http://www.cjyzbgs.moa.gov.cn/gzdt/202012/t20201218_6358385.htm.

[9] Seymour M. Rapid progression and future of environmental DNA research. *Communications Biology*. 2019, **2**(1): 80. 10.1038/s42003-019-0330-9

[10] Yang HL, Zhang H, Du H. A framework for standardizing the processes of eDNA monitoring and an accessible vision of the future. *Journal of Lake Sciences*. 2023, **35**(01): 12-31. 10.18307/2023.0100[杨海乐，张辉，杜浩. eDNA监测方法标准化框架及未来图景. *湖泊科学*. 2023, **35**(01): 12-31. 10.18307/2023.0100]

[11] Yao M, Zhang S, Lu Q, *et al.*. Fishing for fish environmental DNA: Ecological applications, methodological considerations, surveying designs, and ways forward. *Molecular Ecology*. 2022, **31**(20): 5132-5164. 10.1111/mec.16659

[12] Donald J, Murienne J, Chave J, *et al.*. Multi-taxa environmental DNA inventories reveal distinct taxonomic and functional diversity in urban tropical forest fragments. *Global Ecology and Conservation*. 2021, **29**(29): e1724. 10.1016/j.gecco.2021.e01724

[13] Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Altermatt F. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*. 2020, **29**(22): 4258-4264. 10.1111/mec.15643

[14] Xing YC, Gao WR, Bai J, *et al.*. Applications of environmental DNA in lake biodiversity. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2022, **46**(01): 137-148.[邢迎春，高婉茹，白洁等. 环境DNA在湖泊生物多样性研究中的应用. *水生生物学报*. 2022, **46**(01): 137-148.]

[15] Sehnal L, Brammer-Robbins E, Wormington AM, *et al.*. Microbiome Composition and Function in Aquatic Vertebrates: Small Organisms Making Big Impacts on Aquatic Animal Health. *Frontiers in Microbiology*. 2021, **12**: 567408. 10.3389/fmicb.2021.567408

[16] Yang HL, Wu JM, Du H, *et al.*. Quantifying the Colonization of Environmental Microbes in the Fish Gut: A Case Study of Wild Fish Populations in the Yangtze River. *Frontiers in Microbiology*. 2022, **12**: 828409. 10.3389/fmicb.2021.828409

[17] Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, *et al.*. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*. 2012, **21**(8SI): 1794-1805. 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x

[18] Beng KC, Corlett RT. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*. 2020, **29**(7): 2089-2121. 10.1007/s10531-020-01980-0

[19] Dickie IA, Boyer S, Buckley HL, *et al.*. Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. *Molecular Ecology Resources*. 2018, **18**(5): 940-952. 10.1111/1755-0998.12907

[20] Darling JA, Jerde CL, Sepulveda AJ. What do you mean by false positive? *Environmental DNA*. 2021, **3**(5): 879-883. 10.1002/edn3.194

[21] Mauvisseau Q, Harper LR, Sander M, *et al.*. The Multiple States of Environmental DNA and What Is Known about Their Persistence in Aquatic Environments. *Environmental Science & Technology*. 2022, **56**(9): 5322-5333. 10.1021/acs.est.1c07638

[22] Pont D, Rocle M, Valentini A, *et al.*. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports*. 2018, **8**(1): 10361. 10.1038/s41598-018-28424-8

[23] Jo T, Yamanaka H. Meta-analyses of environmental DNA downstream transport and deposition in relation to hydrogeography in riverine environments. *Freshwater Biology*. 2022, **67**(8): 1333-1343. 10.1111/fwb.13920

[24] Shogren AJ, Tank JL, Andruszkiewicz E, *et al.*. Controls on eDNA movement in streams: Transport, Retention, and Resuspension. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1): 5065. 10.1038/s41598-017-05223-1

[25] Fremier AK, Strickler KM, Parzych J, *et al.*. Stream Transport and Retention of Environmental DNA Pulse Releases in Relation to Hydrogeomorphic Scaling Factors. *Environmental Science & Technology*. 2019, **53**(12): 6640-6649. 10.1021/acs.est.8b06829

[26] Zhang N, Chou BF, Xie YH, *et al.*. Research progress of environmental DNA shedding, decay and transport in aquatic ecosystem. *Transactions of Oceanology and Limnology*. 2021, **43**(03): 129-135. 10.13984/j.cnki.cn37-1141.2021.03.017[张娜，仇保丰，谢艳辉等. 水环境生态系统中环境DNA脱落、衰变和运输过程的研究进展. *海洋湖沼通报*. 2021, **43**(03): 129-135. 10.13984/j.cnki.cn37-1141.2021.03.017]

[27] Jo T, Minamoto T. Complex interactions between environmental DNA (eDNA) state and water chemistries on eDNA persistence suggested by meta-analyses. *Molecular Ecology Resources*. 2021, **21**(5): 1490-1503. 10.1111/1755-0998.13354

[28] Thalinger B, Kirschner D, Pütz Y, *et al.*. Lateral and longitudinal fish environmental DNA distribution in dynamic riverine habitats. *Environmental DNA*. 2021, **3**(1): 305-318. 10.1002/edn3.171

[29] Carraro L, Stauffer JB, Altermatt F. How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*. 2021, **3**(1): 157-172. 10.1002/edn3.137

[30] Nukazawa K, Hamasuna Y, Suzuki Y. Simulating the Advection and Degradation of the Environmental DNA of Common Carp along a River. *Environmental Science & Technology*. 2018, **52**(18): 10562-10570. 10.1021/acs.est.8b02293

[31] Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, *et al.*. Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*. 2014, **48**(3): 1819-1827. 10.1021/es404734p

[32] Yang HL, Du H, Qi HF, *et al.*. Watershed biological information flow driven by natural runoff in Shaliu River Basin on Qinghai-Tibet Plateau indicated by environmental microbes. *Acta Ecologica Sinica*. 2021, **41**(09): 3475-3487. 10.5846/stxb202001010001[杨海乐，杜浩，祁洪芳等. 青藏高原沙柳河流域自然径流驱动的流域生物信息流量化特征——以环境微生物为指标. *生态学报*. 2021, **41**(09): 3475-3487. 10.5846/stxb202001010001]

[33] Yang HL, Du H, Qi HF, *et al.*. Effectiveness assessment of using riverine water eDNA to simultaneously monitor the riverine and riparian biodiversity information. *Scientific Reports*. 2021, **11**(1): 24241. 10.1038/s41598-021-03733-7

[34] Yang HL, Chen JK. Meta-ecosystem: Achievements in the first 15 years and the prospectives. *Acta Ecologica Sinica*. 2018, **38**(13): 4537-4555. 10.5846/stxb201706241142[杨海乐，陈家宽. 集合生态系统研究15年回顾与展望. *生态学报*. 2018, **38**(13): 4537-4555. 10.5846/stxb201706241142]

[35] Yang HL, Zhang H, Wu JM, *et al.*. Simulating the impacts of parallel samples on the estimations of upstream-to-downstream watershed biological information flow. *Acta Ecologica Sinica*. 2022, **42**(13): 5211-5225. 10.5846/stxb202104271109[杨海乐，张辉，吴金明等. 模拟计算平行样对流域生物信息流估算的影响. *生态学报*. 2022, **42**(13): 5211-5225. 10.5846/stxb202104271109]

[36] Wei N, Nakajima F, Tobino T. A microcosm study of surface sediment environmental DNA: decay observation, abundance estimation, and fragment length comparison. *Environmental Science & Technology*. 2018, **52**(21): 12428-12435. 10.1021/acs.est.8b04956

[37] Klymus KE, Merkes CM, Allison MJ, *et al.*. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*. 2020, **2**(3): 271-282. 10.1002/edn3.29

[38] Jo T, Arimoto M, Murakami H, *et al.*. Particle size distribution of environmental DNA from the nuclei of marine fish. *Environmental Science & Technology*. 2019, **53**(16): 9947-9956. 10.1021/acs.est.9b02833

[39] Li M, Shan XJ, Wang WJ, *et al.*. Studying the retention time of Fenneropenaeus chinensis eDNA in water. *Progress in Fishery Sciences*. 2020, **41**(01): 51-57. 10.19663/j.issn2095-9869.20180906005[李苗，单秀娟，王伟继等. 环境DNA在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例. *渔业科学进展*. 2020, **41**(01): 51-57. 10.19663/j.issn2095-9869.20180906005]

[40] Andruszkiewicz Allan E, Zhang WG, C. Lavery A, *et al.*. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*. 2021, **3**(2): 492-514. 10.1002/edn3.141

[41] Deiner K, Altermatt F. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *Plos One*. 2014, **9**(2): e88786. 10.1371/journal.pone.0088786

[42] Tillotson MD, Kelly RP, Duda JJ, *et al.*. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*. 2018, **220**: 1-11. 10.1016/j.biocon.2018.01.030

[43] Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, *et al.*. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*. 2014, **14**(1): 109-116. 10.1111/1755-0998.12159

[44] Stoeckle BC, Kuehn R, Geist J. Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (Margaritifera margaritifera L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 2016, **26**(6): 1120-1129. 10.1002/aqc.2611

[45] Yang HL, Wu JM, Zhang H, *et al.*. Environmental DNA metabarcoding utilization efficiency in monitoring large river fish species composition: a case study in the Wuhan transect of the Yangtze River. *Journal of Fishery Sciences of China*. 2021, **28**(06): 796-807. 10.12264/JFSC2021-0556[杨海乐，吴金明，张辉等. 大型河流中鱼类组成的eDNA监测效率:以长江武汉江段为例. *中国水产科学*. 2021, **28**(06): 796-807. 10.12264/JFSC2021-0556]

[46] Deiner K, Fronhofer EA, Mächler E, *et al.*. Environmental DNA reveals that rivers are conveyer belts of biodiversity information. *Nature Communications*. 2016, **7**(1): 12544. 10.1038/ncomms12544

[47] Jia Y, Zhao S, Guo W, *et al.*. Sequencing introduced false positive rare taxa lead to biased microbial community diversity, assembly, and interaction interpretation in amplicon studies. *Environmental Microbiome*. 2022, **17**(1). 10.1186/s40793-022-00436-y

[48] Barnes MA, Turner CR. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*. 2016, **17**(1): 1-17. 10.1007/s10592-015-0775-4

[49] Jerde CL, Olds BP, Shogren AJ, *et al.*. Influence of Stream Bottom Substrate on Retention and Transport of Vertebrate Environmental DNA. *Environmental Science & Technology*. 2016, **50**(16): 8770-8779. 10.1021/acs.est.6b01761

[50] Turner CR, Uy KL, Everhart RC. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*. 2015, **183**(SI): 93-102. 10.1016/j.biocon.2014.11.017

[51] Eichmiller JJ, Best SE, Sorensen PW. Effects of Temperature and Trophic State on Degradation of Environmental DNA in Lake Water. *Environmental Science & Technology*. 2016, **50**(4): 1859-1867. 10.1021/acs.est.5b05672

[52] Jo T, Arimoto M, Murakami H, *et al.*. Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*. 2020, **2**(2): 140-151. 10.1002/edn3.51

[53] Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*. 2015, **183**(SI): 85-92. 10.1016/j.biocon.2014.11.038

[54] Seymour M, Durance I, Cosby BJ, *et al.*. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology*. 2018, **1**(1): 4. 10.1038/s42003-017-0005-3

[55] Bochove K, Bakker FT, Beentjes KK, *et al.*. Organic matter reduces the amount of detectable environmental DNA in freshwater. *Ecology and Evolution*. 2020, **10**(8): 3647-3654. 10.1002/ece3.6123

[56] Jo T, Murakami H, Masuda R, *et al.*. Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*. 2017, **17**(6): e25-e33. 10.1111/1755-0998.12685

[57] Jo T, Murakami H, Masuda R, *et al.*. Selective collection of long fragments of environmental DNA using larger pore size filter. *Science of the Total Environment*. 2020, **735**. 10.1016/j.scitotenv.2020.139462

附已有审稿意见和修改说明，恭请各位同行批评！

谨在此感谢先前同行评议人的评论与建议。具体如下

修改说明 V3

尊敬的编辑您好：

首先，非常感谢您和审稿专家的评阅和建议，帮助我们提高本文的质量。

我们已根据审稿专家的审稿意见，对本文进行了进一步的打磨和完善（修改部分已用红色标注）。审稿人针对黑箱模型、关于计算假设、关于概率性量化等问题（可能是这些问题）的质疑，我们在修改说明中进行了解释，但因问题的复杂性无法在本文中详尽论证，同时考虑到文章的可读性，我们删减整合了先前在文章中补充的对相关争议问题的解释与回应内容。如果审稿人愿意赐教，我们期待与审稿人进行细致而深入的交流，针对本研究思路、研究方法进行各方面问题的辨析讨论，用一篇专题文章系统进行相关探讨论述，应该能够一定程度上说清楚一些事情。至于是否能够达成共识，是否能够获得审稿人对此非主流的研究思路的认可，尚不敢预判。

文章本次的主要修改归纳如下：

1. 根据审稿人的建议，对标题进行了修改，修改为“eDNA 监测空间分辨率量化的方法研究：以长江中游平水期为例”，并对摘要进行了相应微调，相应修改了英文标题和摘要；

2. 根据审稿人的建议，对前言部分第三段、第四段进行了修改整合，并基于相关内容整合需求，对 1.3 小节和 1.4 小节内容进行了修改调整；

3. 根据审稿人的建议，对前言最后一段和 1.1 小节的采样断面设置的相关表述进行了调整；

4. 根据审稿人的建议，对图 1、表 1、图 4、表 2、图 5 的相关要素进行了修改；

5. 根据审稿人的建议，对 1.2 小节的实验步骤进行了补充修改。

根据文章修改规程，我们对文章进行了修订模式的修改，并生成了两个版本（修订模式版、最终带标记版）。我们在稿件中上传了最终带标记版，其中修订之处已用红色标记，

在附件中上传了带修订痕迹的修改稿，其中包括所有修订痕迹，谨此说明。

再次对审稿人和编辑表示感谢。

作者

2023 年 3 月 21 日

作者针对“第 1 审稿人”审稿意见的修改与说明：

环境 DNA 随着水的流动迁移，一直是影响其在流域中进行生物多样性评估的制约因素。本文通过黑箱研究的思维框架，将复杂过程简并将复杂问题简化，只依据输入输出而进行统计性量化，利用流域生物信息流 WBIF 确定 eDNA 监测空间分辨率（系列）值及其可信度、覆盖度。该研究对长江中游 eDNA 监测断面设置提供量化参考，为其它河流或河段 eDNA 监测分辨率估算提供方法借鉴，非常有意义。我同意作者的黑箱理论，在实际应用中所要监测的 eDNA 不是单一来源也不是单一种类，无法搞清楚 eDNA 释放源确切在哪里。本文对于后续将 eDNA 应用在河流监测时的采样设计提供了依据。

以下是我在阅读作者的文章，修改说明，以及上一轮的审稿意见及作者回复后，我的一些意见。

1 作者关于采样设计中的描述一直是“设置 30 个采样断面，断面间隔在 30 km 左右“，其实结合表 1，我认为，关于这个的描述，作者应通篇修改为”在 30 个连续的采样站位进行采样，形成了 29 个断面”类似的表达，否则很难理解作者在进行水样采集时，是如何进行采样的。

修改说明：【感谢审稿人的建议。可能审稿人此处有笔误或者误解，采样站位和采样断面所指的是同一个对象客体。我们在长江中游（从宜昌到湖口）以近似均分的方式设置了 30 个采样断面，相邻两个采样断面之间的河流径流距离预设在 30km 左右（因为是乘船自下游

往上游走，进行采样，受到江中航运因素的影响，没有能够完全卡在每 30km 采样一次）。对于可能造成审稿人误解的因素，我们已在文中进行了修改（具体见 1.1 小节）。】

2 图 1，表 1， 图 4 和表 2 需要进行完善：建议在图 1 中加上 宜昌-洞庭湖-汉江-湖口等关键地理位置，否则对于长江流域不熟悉的读者很难跟得上作者在文章中的描述。另外我在图 1 中找不到 MY18 的站位

图 4 和表 2 中的备注，建议加上具体采样站位，比如“Middle reach 指从宜昌断面到湖口断面（MY30-MY1）; Reach 1 指从宜昌断面到洞庭湖汇入口上游断面（MY30-MY18），Reach 2 指从洞庭湖汇入口下游断面到汉江汇入口上游断面（MY17-MY11），Reach 3 指从汉江汇入口下游断面到湖口断面（MY10-MY1）”。表 1 中，反而是需要对 Reach1-3 加上对应的文字描述。**修改说明：**【非常感谢审稿人的建议。已按照意见进行了修改（具体见图 1，表 1，图 4 ，表 2，图 5）。】

3 L136，建议说明清楚在提取 eDNA 时，同一个站位获得的 2~3 张滤膜是如果进行处理的？是分开提取，在上层析柱的时候混合，还是分别提取后，将提取后的 DNA 进行混合？

修改说明：【感谢审稿人的问题。同一个站位获得的 2~3 张滤膜，通常受提取试剂盒的提取柱容量的限制是选其中一张来进行提取，基本上能够满足实验需求（以提取物的 DNA 浓度和 PCR 预实验结果来判断），其它通常是作为备用材料。当首次提取无法满足实验需求的时候，或在做扩展实验的时候，会对备用材料进行提取，根据具体需求进行单独使用，或者混合浓缩。已在文章补充说明（具体见 1.2 小节）。】

4 公式 1 中公式 2 中最后算出来的值都是用 e 进行表示？是否合适？如果计算出来的都是“流域生物信息流的累计输移效率”那后续进行画图时用的时哪个公式得出的值？比如图 3. 而图 3 中又出现了“上下游采样断面样品检出物种数比值”这个概念，有点像公式 1 得出的。但是公式 1 的计算结果，其应该是小于 1 的数。请对此说明。还是你的公式 1 是输移效率，公式 2 是累计输移效率。表 2 中的输移能力又是如何计算得出。还是公式 1 是输

移效率，公式 2 是输移能力。

修改说明：【谢谢审稿人的问题。公式 1 中的 e 是通过公式右边的量计算获得。公式 2 中的 e 在公式 2 中为已知量，即用公式 1 中计算所得的 e 值。公式 2 中，通过已知量 e 和 d 的系列数据对（系列数据对的计算在文献[32]中有分解到步的详细说明，在本研究中如果同样进行展开逐步计算说明，篇幅会很大，所以未在文中进行分解到步的详细计算展示），利用演化求解的方式计算获得 t、k、D、l 的近似值，即输移能力、非生命体信息占比、非生命个体生物信息半衰距离、稀释效应。图 3 和图 4 中的输移效率和累计输移效率用的公式 1 中计算所得的 e 值。e 值是上下游共有种类数除以上游所有种类数；上下游采样断面样品检出物种数比值是上游所有种类数除以下游所有种类数。表 2 中的输移能力、非生命体信息占比、非生命个体生物信息半衰距离、稀释效应是基于已知量 e 和 d 的系列数据对通过公式 2 的演化求解计算所得的近似值；公式 2 中的输移效率是基于求解所得的 t、k、D 的近似值通过公式 2 计算所得的。】

5 L147-149 每个样品的 PCR 产物在纯化后，经定量后是否进行等摩尔量进行混合。

修改说明：【感谢审稿人的问题。不同样品根据测序量需求，定各样品的 PCR 产物使用量，不一定进行等摩尔量混合。已在文中对相关步骤进行了修改补充说明（具体见 1.2 小节）。】

作者针对“第 2 审稿人”审稿意见的修改与说明：

好几个点指出 3 次都没有改正。

希望认真改正后终审。

修改说明：【感谢审稿人的评论。在关于黑箱模型、关于计算假设、关于概率性量化等问题上，我们可能与审稿人存在一定的意见不一致，在历次修改中尽力修改补充、在相关修改说明中也尽力阐述我们对本研究中采用黑箱模型、进行相关计算假设、选用概率性量化表述的理由（本研究思路是在传统研究思路短时期内难以得出一个便宜快捷计算方法之前采取的权宜之计），在这些方面先前版本已在文中增加了比较多的内容，虽然相关内容的增加

已对文章整体的可读性产生影响（已有审稿人提出此处显得冗长），但这些内容（受文本体量限制）对于审稿人的质疑的回应可能仍然是不足的，可能审稿人仍然不能接受本研究思路。为了完成其它审稿人的修改建议、保障文章整体的可读性，我们对关于研究思路、研究方法当中可能存在的争议问题的解释与回应内容进行了删减整合（具体见前言部分、1.3 小节和 1.4 小节）。

关于研究思路上（包括选择使用黑箱模型的合理性、黑箱模型相关参数计算中所进行的 eDNA 输移生态过程的简化假设的内在设定、对 eDNA 监测空间分辨率进行概率性量化的可行性等）的争议（支持 vs 反对），或许不是本文中用一两段内容能争辩明白的，可能需要另外一篇论文来专程探讨论证。如果审稿人愿意赐教，我们期待和审稿人进行细致而深入地交流，针对本研究思路、研究方法进行各方面问题的辨析讨论。

对于审稿人“指出 3 次都没有改正”，我们未能很好理解审稿人所指的改正是改到什么状况是为正，是放弃当前基于黑箱模型、基本假设、概率性量化等的研究思路？还是另有它指？祈请审稿人明示，我们好做下一步的修改与处理。非常感谢！】

作者针对“第 3 审稿人”审稿意见的修改与说明：

文章讨论了一个有趣的话题，关于环境 DNA 方法在点位布设过程中空间分辨率量化研究，具有很重要的实际应用价值，鉴于本文发表后对于监测业务工作的指导意义及其重要性，本文的书写显得比较啰嗦且冗长，很多概念和表述让读者很困扰，建议作者适当简化处理，更清晰的表述。

修改说明：【谢谢审稿人的批评与指点。我们已对文章相关内容进行简化处理，关于研究思路、研究方法当中可能存在的争议问题的解释与回应，为了提高文章的可读性，谨在当前文章当中进行了删减整合（具体见前言部分、1.3 小节和 1.4 小节），如有条件，将另做一个专题文章进行讨论。】

其他建议如下：

1、本文题目过大，本研究只关注了真核生物和原核生物这两个大类群，但是在实际的水生生物监测和评价过程中可能更关注更加细化的生物学分类，如鱼类、藻类等；

修改说明：【谢谢审稿人的批评与指点。已对文章题目进行修改，修改为“eDNA 监测空间分辨率量化的方法研究：以长江中游平水期为例”（具体见标题）。关注类群的问题，在讨论中（3.2 小节）已有说明，真核生物大类群的结果可以用来近似评估各真核生物细分类群的 eDNA 监测空间分辨率量化特征，虽然会有一定的差异，但其偏差尚可以接受；原核生物大类群的结果主要用来评估环境微生物的 eDNA 监测空间分辨率量化特征。各细分类群可以用细分类群的 eDNA 监测结果来进行 eDNA 监测空间分辨率量化的计算，但因为相关检出信号较少，结果的偶然性误差会比较大，在大空间尺度上，会对量化结果的可靠性产生一定的影响，在小空间尺度上，可以一试，但不保证结果就一定好。**】**

2、本研究样品采集只是针对 6 月份平水期的样品，环境 DNA 空间分辨率受流速，温度等因素影响较大，本研究的在内容和题目相对具有一定的局限，建议补充更多水期、季节的样品，深入讨论；

修改说明：【谢谢审稿人的批评与指点。本文主要是借长江中游作为案例来开展的一个 eDNA 监测空间分辨率量化的方法研究，对此我们已对题目做了相应调整（具体见标题和摘要）。受不同水文情势、不同水温条件、不同季节等的影响，eDNA 监测空间分辨率量化特征可能会存在一定的时空差异，本研究获得的长江中游平水期的 eDNA 监测空间分辨率量化特征也仅作为类似环境条件下的 eDNA 监测断面设置时候的参考，具体结果的分辨率评估要根据具体结果重新进行空间分辨率量化特征计算。本结果不宜直接作为其它监测工作结果的空间定量解释。**】**

作者针对“编辑”意见的修改与说明：

作者修改时有颇多敷衍之处，审稿专家已经指出。此外，标题太大，内容其实只是涉及对原核生物和真核生物的监测，而现在流域水体生物监测中更关注的是相对高等的生物、生

命体监测，前者的意义不能房东，但是需要加强说服力，否则意义会打折扣。

修改说明：【我们努力理解审稿人的批评和建议，并根据本研究的初衷和实际，完善本论文的内容、表述等。针对存在于审稿人意见或认识不一致的地方（主要是对黑箱模型、基本假设、概率性量化等的研究思路），我们努力阐述我们的认知，努力说明我们所认为的研究思路的可取之处。希望能给审稿人看待本研究的非主流研究方法提供非传统的理解框架。其它的能做修改的大问题、小问题我们努力在符合事实的条件下遵照修改。

标题问题，感谢审稿人和编辑的提醒，我们已对其进行修改，修改为“eDNA 监测空间分辨率量化的方法研究：以长江中游平水期为例”（具体见标题和摘要）。

关于类群的问题，我们在讨论中（3.2 小节）已有说明，真核生物大类群的结果可以用来近似评估各真核生物细分类群的 eDNA 监测空间分辨率量化特征，虽然会有一定的差异，但其偏差尚可以接受；原核生物大类群的结果主要用来评估环境微生物的 eDNA 监测空间分辨率量化特征。各细分类群可以用细分类群的 eDNA 监测结果来进行 eDNA 监测空间分辨率量化的计算，但因为相关检出信号较少，结果的偶然性误差会比较大，在大空间尺度上，会对量化结果的可靠性产生一定的影响，在小空间尺度上，可以一试，但不保证结果就一定好。各研究者可以根据所研究的空间尺度自己尝试进行不同等级细分类群的选用来分析 eDNA 监测空间分辨率量化特征。】

修改说明 V2

尊敬的编辑您好：

首先，非常感谢您和审稿专家的评阅和建议，审稿意见对我们进一步修改和完善本文的质量有重要帮助。

我们已根据审稿专家的审稿意见，对本文的细节进行了打磨和完善（修改部分已用红色标注）。部分商榷的内容也已在修改说明中进行了解释和探讨。针对审稿人提出的对本研究中所探索使用的方法的质疑，关于方法中涉及的概念、假设等，先前已在文章修改中补充了相关内容，本次针对具体问题已在修改说明中进行了更进一步的针对性补充说明，考

虑到已有审稿人提出文章略显冗长，故本次针对性补充说明未继续往文章稿件中添加。我们可以理解审稿人对本研究中所探索使用的方法的不理解感、不信任感和不接受感，我们习惯于可控实验研究的思维框架，每个内容都需要是明确而准确的，而本文采用的是黑箱研究的思维框架，将复杂过程简并将复杂问题简化，只依据输入输出而进行统计性量化，两个思维框架从认知层面具有一定的抵牾。对此，我们可以理解，我们也尽可能将其中简并和简化掉的假设、理论、逻辑进行清晰说明，但考虑到文章的篇幅问题和可读性问题，或许我们需要另外再出一个方法说明的文章，根据各位审稿人的问题，将各个简并和简化掉的假设、理论、逻辑进行逐条说明。如果这一设想成行，还希望相关专家多多提宝贵意见。

文章本次的主要修改归纳如下：

1. 根据审稿人的建议，对前言第二段中（L75-L76）的一句表述进行了句式转换，使其更符合科学表述的习惯——“即样点空间间隔最优设置距离，一个样点的 eDNA 监测结果所能反映水生生物组成特征的江段长度，其关键是 eDNA 监测空间分辨率的量化”；

2. 对前言第四段最后一句（L104-L106）的表述进行了补充——“在完全弄清 eDNA 生态学过程机理、完整建立 eDNA 生态学过程模型、全面实现所有参数实时且高时空密度监测之前，通过流域生物信息流分析框架量化 eDNA 监测的空间分辨率（系列）值是可当一用的权宜之法”，以更明确阐述本研究所探索应用的方法的用意和性质；

3. 按照期刊格式要求，表 1 的表头增加了英文翻译；

4. 根据审稿人的建议，在 1.2 节第一段末尾增加了原始数据存放平台的信息和数据所在文件夹的项目编号——“相关序列原始数据已存于国家基因库生命大数据平台（China National GeneBank DataBase, CNGBdb, https://db.cngb.org/）的长江中游 eDNA 序列文件夹中（项目编号: CNP0002410，DOI: 10.26036/CNP0002410）。”；

5. 根据审稿人的建议，在 1.2 节第二段末尾明确了数据处理过程——“统计各采样断面用线粒体 *COI* 基因序列所检出的真核生物（eukaryotes）物种组成和用 16S rRNA 基因序列所检出的原核生物（bacteria）物种组成”；

6. 对 1.3 节第一段中（L164-L166）的一句表述进行了内容补充——“流域生物信息流

输移包括非生命个体生物物质所承载的生物信息的输移（具有随径流衰减的特性）和生命个体所承载的生物信息的输移（不具有随径流衰减的特性）”，以明确两类生物信息输移的性质差异；

7. 根据审稿人的建议，对表 3 中下划线和加粗的含义进行了进一步的明确说明——“下划线和加粗用以标注可信度与覆盖度达到平衡，或临界达到 80%、90%的可信度与覆盖度值”；

8. 对 3.2 节第二段中（L318-L319）的一句内容进行了补充——“在长江武汉段单 eDNA 样品的鱼类物种检出平均仅 26 种左右（9~39）”，明确样品检出物种数的偶然误差情况；

9. 根据审稿人的建议，对 3.2 节第四段中（L336-L337）的一句内容进行了语句调整——“在 95%的目标 eDNA 颗粒完成沉降时，eDNA 可能已输移了 334.0~1272.7 m，在 99%的目标 eDNA 颗粒完成沉降时，eDNA 可能已输移了 513.5~1,956.4 m”，使其意义表述更通俗易懂；

10. 对 3.2 节第四段中（L341-L344）的一句内容进行了补充——“本研究采用流域生物信息流分析框架分析估算 eDNA 监测空间分辨率的相关量化特征，面对 eDNA 的生态学过程中难以控制的复杂性、偶然性，自始至终采用统计视角，不同于传统的针对特定物种进行具体量化和整合分析的方法，降低了研究的工作量、减少了计算的复杂度、提高了结果的量化水平”，以更明确阐述本研究所探索的方法的意义和价值；

11. 根据审稿人的建议，对 3.3 节第一段中的几句内容进行了补充——“eDNA 监测检出物种的随机性和水体体积自上而下的逐渐增大，导致了单次采样物种检出度的偶然性误差和趋势性降低。”“eDNA 监测从本质上来讲就是随机抽样过程，而 eDNA 在水体中并非均匀分布，所以单个样品中 eDNA 检出物种依然存在随机误差，并且随着采样水域水体体积的增大，水体中各物种的 eDNA 被单次采样采集到并检出的概率在减小。本研究结果中检出物种数的样品间差异和沿着河流向下逐渐减少的趋势（图 2）即是该情况的真实反映，增加样品重复数可以降低其偶然性误差和趋势性误差。”以进一步明确此处探讨的是基于本次实验的单次采样物种检出度的结果，即是不充分采样（实际大规模应用中基本上不可实现充分采样）的结果，要减弱本次实验所产生的类似结果误差，可通过增加样品重复数来

实现；

12. 根据审稿人的建议，对 3.3 节第三段中（L366-L368）的一句内容进行了修改——“在相对低的数值范围内，OTU 聚类相似度和物种注释分类置信度取值越高，获得的统计单元数（物种数）越多，流域生物信息流输移效率估算结果越低”，以严谨地进行相关问题讨论；

13. 根据审稿人的建议，对 3.3 节第三段中（L376）的一句内容进行了修改——“更换具有更高测序质量的测序平台”，以明确措施，进而和目标相合；

14. 对 3.4 节第一段最后一句内容进行了补充——“以最优估值对实际值的偏离不超过 1%、估算值的 99.9%置信区间对实际值的最大偏离不超过 5%的标准选定相应的检出度目标，进而设置采样的重复数”，以明确检出度目标估算的最终目的。

根据文章修改规程，我们对文章进行了修订模式的修改，并生成了两个版本（修订模式版、最终带标记版）。我们在稿件中上传了最终带标记版，其中修订之处已用红色标记，在附件中上传了带修订痕迹的修改稿，其中包括所有修订痕迹，谨此说明。

再次对审稿人和编辑表示感谢。

作者

2023 年 2 月 21 日

作者针对“第 1 审稿人”审稿意见的修改与说明：

修改版本中正文对大部分问题进行了补充，但是第一次的意见中提出的测序数据是否上传到公开数据库，作者虽然做了回复，但正文未见说明。

修改说明：【非常感谢审稿人指出的问题。相关序列原始数据已存于国家基因库生命大数据

平台（China National GeneBank DataBase, CNGBdb, https://db.cngb.org/）的长江中游 eDNA 序列文件夹中（项目编号: CNP0002410，DOI: 10.26036/CNP0002410）。已在文中 1.2 节第一段末尾补充了相关信息。】

另外表 3 中的下划线和加粗意义，虽然做了说明，但是还是不清楚。如好多数字高于 80%却并没有加粗和加下划线。

修改说明：【非常感谢审稿人指出的问题。标注的是达到 80%、90%临界的值，而非高于 80%、90%的值。已在文中（L289）进行了修正说明。】

1.Line 360-361,“在一定的数值范围内,OTU 聚类相似度和物种注释分类置信度取值越高，获得的物种数（统计单元数）越多” 表述错误。物种注释分类置信度和物种数量无关，物种总数量在划分 OTU 的时候已经确定。置信度越高，能被鉴定出分类信息的物种数会更少，但是鉴定出的物种分类越准确。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。在达到顶阈值的情况下，物种注释分类置信度越高就有越多的 OTU 无法被注释到特定物种，导致注释出的物种数越少；在未达到顶阈值的情况下，物种注释分类置信度越高就有越少的 OTU 被错误归并到某一近源物种，导致注释出的物种数越多。在本研究中即是后一种情况。已在文中（L366-L368）进行了修改。】

2.Line 362-363, “物种水平和 OTU 水平的流域生物信息流相比（OTU 水平的统计单元显然要比物种水平的统计单元要多要细分）” 表述错误。OTU 全称为操作分类单位，指代的就是物种。

修改说明：【非常感谢审稿人意见。审稿人可能理解有误。OTU (Operational Taxonomic Unit) 即分类操作单元，根据 OTU 聚类相似度设置，可能高于物种的分辨率（比如物种注释中多个 OTU 被注释为同一个物种），可能与物种的分辨率相当（比如物种注释中每个 OTU 对应一个物种），也可能低于物种的分辨率（比如一个 OTU 中包含了多个物种）。在通常的使用过程中，OTU 聚类相似度取值往往要高于物种注释分类置信度取值，获得的 OTU 数量比

物种数量要高，即普遍存在物种注释中多个 OTU 被注释为同一个物种的情况。在本研究中即是如此。已在文中（L368-L369）的表述上做了修改。】

3.Line 368, 什么是“标签跳跃”？

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。高通量的测序仪每一条 lane 的测序能力都远大于一个样本所需的数据量，为了避免试剂浪费，往往将不同样本混合在一起测序。为了区分不同样本，通常将不同序列的寡核苷酸片段（样本标签）加在样本一端（或者两端），获得测序数据后通过样本标签将分属于不同样本的测序数据分别整理归类。高通量测序过程中，一些样本标签在高通量测序仪 Flow Cell 里的某些特殊机制的作用下发生低概率的跳跃而被分配到错误的样本上（标签跳跃），导致样本标签的错配，最终使得一个样本出现了少量低丰度的假阳性序列结果。】

4.Line 322, “16S rRNA 基因注释出来的所有 bacteria 门类下的物种” 表述错误。这对引物也能扩增出古菌。文中未见作者去除检测到的古菌序列。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。16S rRNA 基因测序结果在最终统计分析的时候只选择了 bacteria 门类下的物种。CO1 基因测序结果在最终统计分析的时候只选择了 eukaryota 门类下的物种。已在 1.2 节最后一段最后一句进行补充说明。】

作者针对“第 2 审稿人”审稿意见的修改与说明：

文章修改稿中作者增加了对自定义概念的大量解释说明，但并没有解决审稿人提出的逻辑问题，且增加的内容较为冗长，不能用简单明了的表述解释清楚。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。因为本文是探索利用流域生物信息流框架对 eDNA 监测空间分辨率进行量化研究的初步呈现，所以里面存在比较多的与传统认知有距离的概念、假设、思路、框架，为了能够较为充分地阐述相关问题，的确需要对相关概念、假设、思路、框架进行大量解释说明，甚至还依旧存在一些读者存疑的问题未来得及仔细阐述。审

稿人提出的逻辑问题，就是把复杂的生物信息进行简并简化的问题，我们在努力尝试把为什么简并为“本地生成的生物信息 vs 上游输移来的生物信息”和“非生命个体的生物信息 vs 生命个体的生物信息”的问题说清楚，只是因为新方法的思路和传统认知有较大差异，在传统认知框架下来理解这个问题存在较多疑问，不容易一次性说清楚。计划后面准备一个专门的针对方法本身概念、假设、思路、框架的阐释的文章，用专门的问答方式来解释其中的疑点，期待审稿人届时能够提出更多的问题。】

1.作者指出 eDNA 监测空间分辨率是 eDNA 监测结果所能对 eDNA 释放源的空间分布进行辨识的最小空间单元，即最短 eDNA 输移距离。前提是要搞清楚 eDNA 释放源在哪里，根据作者所选择的生物类群和分析方法，并没有明确这一点。这个问题与审稿人第二条审稿意见有关联，但作者仍然没有解决。

修改说明:【非常感谢审稿人的意见。在实际应用中所要监测的 eDNA 不是单一来源也不是单一种类，无法搞清楚 eDNA 释放源确切在哪里，所以需要通过黑箱把问题概率化来描述。我们认为，自然条件下的复杂问题不能依靠实验室环境的可控实验思路来解决，所以提出用监测断面把连续体的河流进行分段处理，对每一段的 eDNA 检出当做本段的输出和下一段的输入，把每一段当作一个黑箱，用输入输出来估算其整体输移的统计量的量化参数，然后用概率来表述 eDNA 的可检出输移距离。】

2.对于输移效率公式，作者回复逻辑不清，并没有直接回答该问题，只是罗列了一些自己的理解。不论非生命物质或生命物质，都可能在不同生境中存在共有，迁移和固有如果不做区分无法达到作者计算输移效率的目的。

修改说明:【非常感谢审稿人的意见。对于输移效率公式，从传统思维框架来看存在很多因简并简化带来的疑问，我们理解，我们也努力尝试进行一个一个疑点回答和解决，只是限于篇幅无法在本文中全部进行补充说明，计划后续撰写一篇针对性的疑问解答，期待与审稿人的深度交流。非生命个体的生物物质会随着输移降解，生命个体不随着输移降解。上下断面存在共有的固有非生命个体的生物物质，则说明上下断面间存在相应的生命个体，

因而将其归入生命物质来量化。】

3.作者回复“在接受某一可信度（和覆盖度）数值的情况下，可选定对应的输移距离为 eDNA 监测空间分辨率值”，即表明文章中并没有计算分辨率，而是选择既定的分辨率，1.4 小标题中的监测空间分辨率估算存在逻辑漏洞。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。本研究进行的 eDNA 监测空间分辨率值量化研究中，空间分辨率是设的（比如从 1 km 到 200 km，图 5），在设定的一系列空间分辨率下计算其对应的可信度（和覆盖度），根据所接受的可信度（和覆盖度）选择对应的空间分辨率为监测样点布设时所采用的空间分辨率。】

4.作者的回复不具备说服力，反而进一步体现了文章分析方法存在的问题。上游到下游水体体积变大，并不能直接推导物种变少，下游水体增加不是用清水对上游的直接稀释，而是各支流湖泊来水的汇集，除了水量增加，物种来源也增加了。且作者明确“先前其它研究中的结果也显示，从上游到下游水体中的 eDNA 可检出物种数是有一定增长”，作者的结果与前人不符，并不能直接推导出只是误差，可能是分析方法的错误，作者并没有提供有力的证明。**修改说明：**【非常感谢审稿人的意见。在取样充分的情况下，上游到下游水体体积变大，不会导致物种变少，甚至应该有所增加。对于有限取样来讲，上游到下游水体体积变大，而 eDNA 在水体中非均匀分布，则会概率性地导致物种检出减少。】

5.作者指出“环境因子相关性的可行度和解释度并不高”，是作者的假设并没有被证实，基于该假设的实验方案也很难具有说服力。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。“通过各环境因子的参数化、对 eDNA 输移降解过程的模型化来实现 eDNA 监测空间分辨率的量化，短期内还将继续面临较大困难和不确定性”是研究现状，近几年来研究环境因子影响 eDNA 生态学过程的研究已经非常多，国内国外都有，但一直未形成一个简洁明确通用的量化关系，也一直未能推动 eDNA 监测结果空间关系的便捷定量。我们认为，在一条研究路径走起来不顺利的时候，走另一个研究路径应

该是可接受的。我们希望我们开展的另一条研究路径的探索是有益的，是可以被学界所容忍的。】

6.作者表明二个参数的相关性可以被推导，不论大于 1 和小于 1 都是相关，这个相关性是作者设定的，而并不是通过统计学分析得到的。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。两个参数的相关性可以被推导，但其中的相关系数是通过统计性分析得到的。如果没有基于数据的统计分析，就无法判断两个参数之间是正相关还是负相关。】

其它问题不再赘述，总体来说，文章逻辑思路并不完善，分析方法存在明显漏洞，结果不具有说服力。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。或许审稿人对本文的不理解来自于可控实验研究的思维框架，每个内容都需要是明确而准确的，而本文采用的是黑箱研究的思维框架，将复杂问题简化为依据输入输出而进行的统计性量化，两个思维框架从认知层面具有一定的抵牾。对此，我们可以理解，我们也尽可能将其中简化掉的假设、理论、逻辑进行清晰说明。】

作者针对“第 3 审稿人”审稿意见的修改与说明：

比第一版有了大幅度的修改，但是写的比较的啰嗦，可以写的更简洁化。

1.3 流域生物信息流分析：虽然你有强调采样点不受上流样点的影响（只是计算形式上的），并在讨论上也大量引用 Jo 所总结的论文，但是这是 eDNA 研究目前无法解决的一个课题。特别是讨论部分整体写的有点啰嗦。应该根据自己的结论进行讨论，而不是知道的有关于 eDNA 的内容都写。可以写的再简洁一些。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。本文是基于黑箱模型流域生物信息流分析框架（eDNA 输移量化特征分析框架）来评估 eDNA 监测空间分辨率的第一篇文章，用了新方法，也有比较多的新结果，可能审稿人和读者会有比较多的疑惑和不信任感，根据先前审稿人的提

醒，通过比较详实的不同来源结果的比较分析可能有利于审稿人和读者理解和评估新方法新结果。感谢您的建议，我们已按要求进行了相关修改，希望在能够充分表达所要表达的意涵的情况下，能够尽可能做到简洁清晰。】

关键词使用了“环境 DNA 监测”，在摘要和正文里使用的是 eDNA，请统一。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。为了覆盖检索，根据关键词选择的建议规则，我们特意选择了最常用的两种表述，以覆盖相关检索词，谨此向您解释说明。】

L.75-76:括号内的红色部分，请把疑问句改成简洁的陈述句。

修改说明：【谢谢审稿人的指点。已按要求修改（L75-L76）。】

L.79:第一版的时候也有提到，blackbox 不应该直译成黑箱，应该有更符合中文的翻译。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。“Blackbox”在学术界的标准译法就是“黑箱”，是全国科学技术名词审定委员会已审查发布的，其官方网站 https://www.termonline.cn/index 可进行查阅。】

L.213-215:这次检测出来的序列可以分类到种？灵敏性那么高？不是用 OTU 来总结？（如果是我误会了请无视）

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。通过序列的 OTU 聚类和物种注释，的确可以分类到种。在物种注释过程中，有多个 OTU 被注释为同一个物种的情况。在本研究中 OTU 是比物种更精细的分类单元。因为在 eDNA 监测中我们往往关注的是物种的存在与否，所以在进行最后定量的时候通常使用物种，而不用 OTU。】

L.235:“具有微弱分段性特征的长尾状态”，想要说的是，变化不明显吧，长尾状态的描述是比较普遍？

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。长尾状态是指到后面累计输移效率下降的很慢，不明

显。“长尾状态”是对图形的描述。】

L.316:检测度→检测率？

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。检出度，亦即检出率。】

L.330-333:完成 95%的目标 eDNA 和完成 99%的目标 eDNA 是指什么？请补充。

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。“完成 95%的目标 eDNA 颗粒沉降”，即目标 eDNA 颗粒中有 95%已经沉降下来；“完成 99%的目标 eDNA 颗粒沉降”，即目标 eDNA 颗粒中有 99%已经沉降下来。已在文章中（L336-L337）进行了修改。】

L.368-369:这里提到“标签跳跃”导致一部分结果存在误差。“标签跳跃”由来的序列理论上不会很多，顶多 2 位数的 reads 数。所以我不认为这会对结果造成大的影响（个人观点，请参考）。你在下一句提到的更换测序平台，“标签跳跃”这个现象是每次上机都会存在的，通过更换测序平台这样做法是无法避免。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。标签跳跃导致的假阳性序列往往是低丰度的序列，其种类数和测序数据量有一定的相关性，但我们没有具体做相关研究。有文献（Jia, Y., Zhao, S., Guo, W. et al. Sequencing introduced false positive rare taxa lead to biased microbial community diversity, assembly, and interaction interpretation in amplicon studies. Environmental Microbiome 17, 43 (2022). https://doi.org/10.1186/s40793-022-00436-y）显示这个影响或许比我们一般想象的要大，这个文献也指出，不同的测序平台的测序精度不一样，通过选择更高精度测序平台或许可以降低标签跳跃导致的假阳性序列，进而减弱其对相关结果的影响。】

L.374：提到的浓度是指回收的 eDNA 量？

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。“营养盐组成和浓度”，这里的浓度指的是自然环境中营养盐的浓度。】

修改说明 V1

尊敬的编辑您好：

首先，非常感谢您和审稿专家的不吝赐教，审稿意见对我们修改和提升本文的质量有重要帮助。

我们已根据审稿专家的审稿意见，重新梳理了本文的定位和行文逻辑，将文章定位为服务于方法探讨的案例研究，并对方法相关的研究背景、基本概念、基本假设、基本路径进行了系统地补充完善。同时，根据审稿人所提出的意见、建议、问题，对本文中存在的细节问题一并进行了补充、修改、完善。另外，基于对文章的反复通读及对文句的仔细斟酌，我们对文章的行文和表述也进行了系统地修改、完善。希望修改后的版本能够比较充分、比较妥当地展示本研究的结果结论以及我们所想表达的内容。鉴于我们能力有限，可能依旧有不周全的地方，还请审稿人不吝赐教。

文章的具体修改已在文中用红色标注。主要修改归纳如下：

1）将本文定位为方法探讨，为了使得本文能够独立、清楚阐述相关内容，为了能够让读者不必翻阅先前的文献即可理解方法中的相关设计和假设，本文对方法背景进行了整体性补充说明，尤其是对方法相关的基本概念（eDNA 监测空间分辨率、可信度和覆盖度、流域生物信息流等）、基本假设（流域生物信息流的空间关系、要素组成等）、基本路径（从流域生物信息流到 eDNA 监测空间分辨率）等进行了补充说明（在前言部分增加了第四段内容并在第五段末尾增加了本文意旨的说明，在方法部分 1.3 节增加了第一段内容并对最后一段进行了细节信息补充，在方法部分 1.4 节增加了第一段内容并对第二段进行了补充解释说明）；

2）在方法部分增加了采样过程的相关细节参数说明（具体见方法部分 1.1 节和图 1，表 1），增加了扩增所用引物的相关细节信息（具体见方法部分 1.2 节）；

3）在结果部分增加了测序结果的概述（具体见结果部分 2.1 节和图 2），增加了图 2 和

图 3 中 R^2 的标注，增加了表 3 中下划线和加黑字体的用意标注；

4）在讨论部分增加了对本研究结果的阐释说明及与他人研究结论的比较分析（具体见讨论部分 3.2 节第三段和第四段），增加了关于序列聚类和物种注释过程中参数设置问题的说明讨论（具体见讨论部分 3.3 节第三段）；

5）在结论部分增加了对 eDNA 监测空间分辨率的概念说明(具体见结论部分第一句)；

6）对文章中部分表述进行了修改调整，以期表意更明了，阅读更顺畅，表达更规范（具体见文章中部分标红的内容）；

7）在文章中增加了部分文献引证（具体见文章中标红部分），并对文献格式和信息进行了梳理和确认（具体见参考文献部分）。

另外，我们对文章进行了反复而仔细的阅读，对文中的字句表述等进行了仔细斟酌和系统地修改完善，希望能够达到表述通俗易懂科学准确。虽然我们努力修改完善我们的稿件，但是鉴于我们的水平有限，请审稿人和编辑部加以理解或者提出进一步修改完善的意见。

根据审稿人的建议，我们对文章进行了非常多的斟酌修改补充，按照“修改稿针对审稿意见的修改部分的内容请加颜色（与原稿）区分”的要求，我们在修改稿中对具有实质性内容修改的部分已标红（图和表的修改只对图题和表头做了标红），对语句疏通、表述修饰等细节处的修改仅做了部分标注，我们在附件中上传了带修订痕迹的修改稿，其中包括所有修订痕迹，谨此说明。

再次对审稿人和编辑表示感谢。

作者

2023 年 1 月 1 日

作者针对“第 1 审稿人”审稿意见的修改与说明：

文章对长江中游水体环境 DNA 进行物种监测分辨率的研究，基于 2 个扩增子的高通量测序分析，展示了丰富的数据分析结果，通过连续采样点的物种组成比对来解析环境 DNA

监测的在不同河道距离的有效性，研究选题对环境 DNA 技术的应用是有价值的，但文章在分析思路和方法上存在一定的问题。

修改说明：【非常感谢审稿人的认可和批评建议。我们已根据审稿人的意见和建议对文章的整体定位和行文逻辑进行了重新梳理，针对分析思路和研究方法部分补充了相关内容，并根据审稿人指出的细节问题修改了相关表述。】

1. 论文的核心主题是空间分辨率，但作者未对“空间分辨率”做出准确的定义和解释，第 74 行作者提到：“空间分辨率，即采样点空间间隔应该设为多少？”采样点设置是人为设定的，而分辨率应该是监测结果显示出来的，二者并不等同。建议作者对空间分辨率给出明确的释义。

修改说明：【非常感谢审稿人的建议，没有对新概念给予明确清晰的定义和阐释是前一版本行文中的缺憾。我们在修改版中（前言第四段）尝试对本研究的核心观念“eDNA 监测空间分辨率”进行尽可能清晰的定义和阐释，因为是新概念，本文给出的定义和阐释可能有不周全的地方，还请审稿人不吝赐教。概念上来讲，eDNA 监测空间分辨率是指，eDNA 监测结果对 eDNA 释放源的空间分布的辨识能力。量化上来讲， eDNA 监测空间分辨率可以描述为，在 eDNA 监测结果对 eDNA 释放源的空间分布的反映满足特定可信度条件下，eDNA 监测结果所能对 eDNA 释放源的空间分布进行辨识的最小空间单元。计算上来讲，eDNA 监测空间分辨率即，满足一定 eDNA 检出可信度（实际应用中或需兼顾考虑 eDNA 检出覆盖度）的最短 eDNA 输移距离。eDNA 监测空间分辨率是估算出来的（系列）值，采样点空间间隔设置是基于空间分辨率（系列）值的可信度和覆盖度进行的空间间隔选择与设置。】

2. 研究方法 1.3 中，累计输移效率公式，作者把上下游共有的物种认同为从上游输移的物种，这种前提作者没有做出解释，缺乏依据，共有物种不一定都是从上游来的，没有交流的不同区域也可能产生共同的物种，建议作者重新考虑相关定义和分析方法。

修改说明：【非常感谢审稿人提出的问题，由于直接引用的先前研究中的计算公式，所以未

在此做清晰说明，是前一版本行文中的缺憾。我们在修改版中（前言第四段和方法 1.3 第一段）对其进行了补充说明。输移效率公式里所指的流域生物信息流输移包括了非生命个体（即不具生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移和生命个体（即具有生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移。而生命个体（即具有生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移包括了客观实际上的生命个体空间移动所指征的生物信息的输移和计算形式上的上下游共有但并无空间迁移的生物信息的输移，后者作为流域生物信息流计算的辅助项，对非生命个体（即不具生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移的计算不产生影响，只影响对生命个体（即具有生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移结果的阐释。在通常分析生命个体（即具有生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移的时候，主要关注环境过滤效应（即生命个体是否可以在连续空间上可生存），而过滤效应对是真实的个体空间迁移还是固有的物种同时分布这两个问题并不做区分。】

3. 研究方法 1.4 eDNA 监测空间分辨率估算，题目是估算分辨率，但内容并未估算分辨率，而是给出了量化空间分辨率的两个指标，可信度和覆盖度，通过这两个指标如何推导分辨率？d 输移距离和作者所指的空间分辨率有何不同？

修改说明：【非常感谢审稿人提出的问题，前一版本行文中未对此两者关系做出明确说明是一个疏漏。我们在修改版（前言第四段和方法 1.4 第一段）中对其进行了补充说明。eDNA 监测空间分辨率，是在 eDNA 监测结果对 eDNA 释放源的空间分布的反映满足特定可信度条件下，eDNA 监测结果所能对 eDNA 释放源的空间分布进行辨识的最小空间单元，是满足一定 eDNA 检出可信度（实际应用中或需要考虑 eDNA 检出覆盖度）的最短输移距离。满足不同 eDNA 检出可信度（和覆盖度）数值下的输移距离（即最小分别空间单元）即 eDNA 监测空间分辨率（系列）值。可信度和覆盖度是用来指征或筛选 eDNA 监测空间分辨率的指标，而非推导 eDNA 监测空间分辨率的指标。在接受某一可信度（和覆盖度）数值的情况下，可选定对应的输移距离为 eDNA 监测空间分辨率值。】

4. 结果部分 2.1 中图 2，检出物种数向下游递减，对这一变化趋势，作者在在 3.1 中 242

行解释为“趋势性误差”，如何区分误差和实际结果？出现这种趋势性误差的原因是什么？

修改说明：【非常感谢审稿人提出的问题。这一问题在讨论 3.3 节第一段中有相关说明。因为 eDNA 采样是对环境中 eDNA 的非均匀随机抽样，当抽样的库越大，单个抽样对库中样本的覆盖度越低。在本研究中从上游到下游水体体积是在不断增大的，但各断面样品重复数和采样量保持恒定，所以结果所出现的检出物种数趋势性降低，我们认为是由实际状况和采样方案共同导致的系统误差。先前其它研究中的结果也显示，从上游到下游水体中的 eDNA 可检出物种数是有一定增长（虽然非持续积累性增长），所以本研究中的趋势性降低，我们认为是误差，而非实际结果。趋势性误差的原因就是非均匀随机抽样过程中，库的不断增大与采样重复数及采样量保持稳定的背离。】

5.　文章在第 80 行、第 244 行、第 281 行等多处指出 eDNA 空间分辨率受各种环境因素影响，但研究未涉及监测断面的环境参数，因此对多项结果的分析和解释缺乏足够的依据。建议补充环境因子相关性分析，来佐证对相关结果的推论。

修改说明：【非常感谢审稿人提出的建议。因为 eDNA 输移和降解所涉及的过程和影响因素非常多也非常复杂，这一方面已有比较多的研究和文献，但目前还没有一个完全影响因子的评估框架，有限的环境参数或许可能能找到一定的相关性，但这种相关性的可信度和可解释度并不高，在单次或者少量几次研究中也无法给出有效的定量关系拟合，所以本研究的设计整体就是以忽略这种复杂性，用只控制输入-输出来对 eDNA 的相关过程进行宏观统计计算（具体见前言第三段）。所以，本研究未对环境因子的相关性进行定量分析，只在相关情况的讨论解释中援引文献略做解释说明。】

6.　结果部分 2.2 中图 3 和第 175 行“不同相邻断面间的 eDNA 输移效率与上下游采样断面样品检出物种数比值负相关”，这两个参数都是根据上下游检出物种数计算的，二者的相关性是否从计算公式上即可推导出来？

修改说明：【非常感谢审稿人提出的问题。二者的相关性可以从计算公式上进行推导，通过计算公式约化，不同相邻断面间的 eDNA 输移效率与上下游采样断面样品检出物种数比值

间的相关系数可以表述为$\frac{Num(S\cap P)*Num(P)}{Num(S)^2}$。但这个相关性系数本身并不能确定是大于 1 还是小于 1，亦即只通过公式推导无法判断两者的相关性是正相关还是负相关。】

7. 研究方法 1.1 中，1.5L 水样用 0.2 的滤膜抽滤时，是否使用多张滤膜？每张滤膜抽滤体积如何控制？滤膜如何提取 DNA 并保证不同采样点间定量分析的一致性？

修改说明：【非常感谢审稿人提出的问题。本研究中在进行水样抽滤时用了多张膜（已在方法 1.1 节第二段中做了信息补充）。每张滤膜的抽滤体积以水样中相关颗粒物浓度（堵塞滤膜的时间）来控制，抽滤前水样摇匀，然后当抽滤下滴的液滴数少于每分钟 40 滴左右时考虑进行换膜。滤膜提取 DNA，采用的试剂盒提取方法，所有样点的滤膜样品的 DNA 提取过程在同一个实验批次中进行，尽力保证提取过程不对不同样点结果产生不一致的影响。考虑到当前技术体系的局限性，结果分析只关注检出物种数，对于各物种的丰度或相对丰度不进行定量分析。】

8. 在 1.2 中 eDNA 测序与分析中，线粒体 COI 序列注释取 97%相似度，而 16S 取 70%，不同扩增子选择特定分类标准的依据是什么？

修改说明：【非常感谢审稿人提出的问题。本研究中注释取的相似度是用的分析程序的默认值，没有进行特别的选择。调整相似度的确会对物种检出数、流域生物信息流、eDNA 监测空间分辨率估算结果产生影响（已在文章中做了补充，具体见 3.3 节第三段），但本研究重点在于方法探索。其他研究在参考或引用本研究结果时需要注意相关方法的前提和参数一致性。】

9. 研究结果中仅有扩增子注释的门类数量，未列举具体物种类别，分析选用的是所有注释物种还是有所筛选？这些物种包括哪些门类，是否具有代表性？尤其是 COI 的结果，真核生物范围广泛，研究具体针对的哪些类群，对其它类群的借鉴意义如何，应有所说明和分析。

修改说明：【非常感谢审稿人提出的问题。分析选用的是所有物种，16S rRNA 基因注释出

来的所有 bacteria 门类下的物种，CO1 基因注释出来的所有 eukaryotes 门类下的物种（已在文章中做了补充，具体见 3.2 节第三段）。细菌类群下的不同细分类群的差异不大，真核生物类群下的不同细分类群应该存在一定的差异。同时由于细分类群中所记录的物种数偏少，进行相关计算会出现比较大的偶然误差，结果的稳定性很差，所以未予以进行细分（具体见 3.2 节第二段）。】

总体来说文章的研究内容和结果并没有支撑题目中的空间分辨率量化的问题，建议对分析目标和方法进行重新规划。

修改说明:【感谢审稿人的批评建议。我们针对审稿人提出的问题，重新对文章进行了梳理，文章定位为方法探讨，对方法涉及的基本概念、基本假设等相关内容进行了补充（前言第四段，方法 1.3 节第一段，1.4 节第一段），对方法涉及的不确定性等相关问题进行了论证（3.2 节第二三四段，3.3 节第二三四段），希望能够足够清晰地阐述本文所要表达的意涵。】

稿件中批注的修改意见和建议

1. L63-L65“eDNA 监测，从水体、沉积物、土壤、混合物等环境样品中直接提取 DNA，利用宏条形码和高通量测序技术对其进行定性或定量分析，高效率地实现非接触、无损伤的多物种（或高级分类单元）监测[9,10]。”这几年出了很多 eDNA 研究的综述，引用综述。

修改说明:【非常感谢审稿人的建议。因为该句论述是对 eDNA 的常规性总结，在非常多综述中都有表述，所以先前版本只择其中 2 篇综述文献进行了标注。修改版本已根据审稿人意见增加了所引用综述的文献数量。】

2. L77“eDNA 监测的空间分辨率量化可通过 eDNA 随径流输移量化特征的黑箱计算来进行。”很多论文有提到对 eDNA 的理解还有很多不清楚的地方，eDNA 本身就是 blackbox。但是不应该直译成黑箱，应该有更适合的中文说法。

修改说明:【非常感谢审稿人的建议。目前对 eDNA 的理解还存在相当多的未知，对 eDNA 的生态学过程的理解也存在相当多的未知，eDNA 本身可以当做 black box 来看待，eDNA

的生态学过程也可以当做 black box 来看待。本研究的研究思路就是将 eDNA 的生态学过程当做 black box 来看待，对其进行整体性量化分析。“black box”对应的中文术语的确是“黑箱”，在技术哲学、经济学、管理学、自动化科学、心理学、生物学、生态学、土壤学等学科中均用的“黑箱”。比如在生态学中，术语“黑箱模型（black box model）”的定义是“对一个内在结构未知的系统，所建立的系统输入和输出关系的模型”。】

3. L80-L81“其中 eDNA 的降解速率受来源（生物类群）、形式（胞内胞外）、初始浓度、温度、介质、BOD、营养状况、pH、紫外线、叶绿素、环境微生物等因素影响。” 介质是什么？这里营养状况是不是太直译了？所引用的论文中指的是水体的营养状况？

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。介质是指 eDNA 所保存的介质，比如水体、沉积物等，已修改为“赋存介质”。营养状况是指水体中营养盐组成及浓度等，的确太直译了，已修改为“营养盐组成及浓度”。所引用的论文中指的是水体的富营养化状况。修改版本已做相应修改。】

4. 背景中 eDNA 内容的比重占太多，反而不能突出在长江中游江段做研究的意义，而一部分内容又和讨论部分重复。

修改说明：【非常感谢审稿人的批评。本研究是一个以方法探讨为目的的案例研究，所以关于方法的背景、问题和研究思路说明略侧重一些，并且根据审稿人的问题和意见进行了进一步的关于方法问题的补充。整体上前言按照“eDNA 监测有助于保障长江水生生物保护和十年禁渔工作的适应性管理 → eDNA 监测的空间分辨率未量化阻碍了其在水生生物常态化监测评估中的应用 → eDNA 监测的空间分辨率量化可通过 eDNA 随径流输移量化特征的黑箱计算来进行 →用流域生物信息流分析框架来量化分析 eDNA 监测的空间分辨率是当前科技发展阶段的权宜之计 → 在长江中游江段开展 eDNA 监测的空间分辨率量化研究具有重要性和示范性”的架构来展开。在长江中游江段做研究的意义在最后一段有一定论述（关键物种的关键栖息生境、自由流淌江段）。前言中有一部分引用内容和讨论部分所

引用内容有一定重叠，但不重复，前言部分的 eDNA 生态学过程的复杂性是用来说明为什么本文用黑箱化计算来处理 eDNA 的输移，讨论部分的 eDNA 生态学过程的复杂性是用来说明 eDNA 在输移过程中存在一定的时空异质性，本研究的结果只是在当前研究条件下当前研究尺度上的统计性表述，而不能据本研究结果来认为 eDNA 的输移是均质线性过程。】

5. 如果可以的话请顺便加上 Reach1，Reac2，Reac3 的范围在 Table 1 里

修改说明：【非常感谢审稿人的建议。我们已根据建议在表 1 里补充了相关信息，并在采样断面设置示意图上也做了相应标注。】

6. L99 "所采集的水样封装好之后放入冰浴泡沫箱保低温。" 就算低温保存 eDNA 也还是很快降解。

修改说明：【非常感谢审稿人的意见。我们也认同审稿人的观点。因为低温条件下 eDNA 降解比在高温条件下降解得要慢一些，所以我们采取了冰浴泡沫箱保低温的措施。因为 eDNA 的生态学过程的时空异质性，以及 eDNA 采样及处理方法所可能引起的误差，所以本研究的最终定量结果具有一定的环境条件局限性和方法局限性，在与本研究类似的环境条件下、方法条件下，本研究的定量化结果才具有比较可靠的参考性，因而本文建议各研究需要根据自己的 eDNA 监测结果来对其 eDNA 监测空间分辨率及有效性进行评估（具体见 3.4 节第二段）。】

7. L99 "带回实验室用 0.2 μm 孔径滤膜进行抽滤。" 每个样品都过滤了 1.5L 水？共用了一张膜还是很多张？

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。我们每个样品都过滤了 1.5L 水，根据每个样品中的颗粒物条件（抽滤多少体积水样堵死一张滤膜），每个样品用了两到三张滤膜。已在方法 1.1 节第二段做了相关信息的补充。】

8. L111-L113"针对真核生物用线粒体 CO I 基因的宏条形码引物 mlCOIintF/ jgHCO2198R

进行 PCR 扩增（片段长度 320 bp 左右），针对原核生物用 16S rRNA 基因的宏条形码引物 338F/ 806R 进行 PCR 扩增（片段长度 410 bp 左右）。”引物不是自己开发的，请加上引用。

修改说明：【非常感谢审稿人的修改建议。已按照审稿人建议增加了引文。】

9. L115，提取完的 DNA 是包含不同生物的 DNA，这里测量浓度，使用 10 ng 的意义不大，不如直接添加了 μL 的 DNA。

修改说明：【非常感谢审稿人的建议。这里的 10ng 主要是通过所提取的 eDNA 样品浓度来计算所需要添加的 PCR 模板 DNA 溶液的体积。因为所提取的 eDNA 样品浓度在不同样品间会有一定差异（9.6 ~96.6 ng/ μL），在 PCR 反应体系配制过程中，个别样品的模板需要增加一点体积或者减少一点体积或者进行稀释选用某一体系，所以常规性地写 10ng。】

10. L115-L119，两个引物的循环数是参考了先行研究吧。开发这个引物的论文，最初不是用于 eDNA 研究，所以个人认为 PCR 的循环数偏少。基本上 eDNA 多物种的循环都在 35～40 之间。

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。这两个引物是非常常用的引物，我们一直在用这两个引物。本研究中两个引物的循环数是通过预实验确定的，预实验中两个引物的循环数是参考我们先前研究的经验确定的。eDNA 扩增子测序，为保证研究中续数据分析的准确性及可靠性，需要尽可能使用低循环数扩增，同时保证每个模板扩增的循环数一致。循环数越高引物偏好性导致的结果误差越大，复制过程中出现的偶然误差所造成的影响越大。本研究正式实验中 PCR 循环数是根据预实验 PCR 产物浓度来反馈调整确定的，确保在最低循环数中使绝大多数模板能够扩增出浓度合适的产物。】

11. L120“PCR 扩增产物在纯化（AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒（AXYGEN 公司））、定量（QuantiFluor™ -ST 蓝色荧光定量系统（Promega 公司））之后在 Illumina Miseq 平台加标准接头、进行建库测序”，定量？请确认

修改说明：【非常感谢审稿人的问题。确实是定量。PCR 扩增产物纯化之后，需要对纯化

的 PCR 扩增产物进行浓度定量，然后进行相应定量地加测序标准接头，再然后进行建库测序。】

12. L128“16S rRNA 基因序列比对 silva138/16s_bacteria 数据库，取 70% 的分类置信度)”，这个标准也太低了吧？估计只能鉴定到科吧？

修改说明：【非常感谢审稿人的提问。针对细菌 16S rRNA 基因序列比对的分类学分析物种注释，70%的分类置信度大家用的比较多，系统默认参数也是 70%。本研究中用 70%的分类置信度共将 8552 个 OTU 注释到原核生物 1 界，59 门，179 纲，423 目，713 科，1593 属，3426 种。考虑到本研究关注的主要是采样断面间的物种组成关系，而并不关注具体的物种是什么，也不太关注具体注释到多少个物种，所以未对分类置信度阈值进行特别的设定。】

13. L135 “（公式 1）”，公式 1 和公式 2 里所要得到的 e 不应该都是输移效率。发在 science reports 时也许遇到的审稿人没有指出来，公式 1 我觉得你没有考虑下游原本就存在的生物。光用你现在的式子无法区分是从上流流下来到下流的还是下流也存在的。按照我对 eDNA 的移动距离的理解相差 30km 的距离基本上不会有影响。你可以看一下今年 Jo 发的 meta 分析的研究。这些年也有关于 eDNA 移动的一些研究。建议再检讨一下。你在讨论中有提到觉得下游的生物多样性要高于上游，但是 DNA 的分布不一定是这样。你们所收集到的样品里很有可能包含了微生物本身。

修改说明：【非常感谢审稿人的评论。公式 1 和公式 2 里的 e（流域生物信息流输移效率），以及流域生物信息流计算框架内所有的 e 并不只包含准确的物理意义上的流域生物信息流输移效率，也包含用以计算的具有物理意义上的流域生物信息流输移效率、物理意义上的逆向流域生物信息流效率，以及上下游样点共有生物类群的生物信息的补充形式上的流域生物信息流输移效率（具体假设见前言第四段）。补充形式上的流域生物信息流输移效率主要是用来开展相关计算，之所以将补充形式纳入进行相关计算，是因为在简单操作中这三者无法完全区分开。

流域生物信息流主要是指生物信息依托于流域生态系统过程在不同空间和系统之间进行传递，是个空间过程，因此其计算有一个空间的假设，即流域需要被化做一系列空间相连的子系统，各子系统内维持/产生自己的生物信息（具体假设见前言第四段）。不同子系统之间的生物信息输移就是流域生物信息流。在实际量化分析当中，由于物理意义上的流域生物信息流输移效率、物理意义上的逆向流域生物信息流效率和上下游样点共有生物类群的生物信息三者无法通过简单操作完全区分开，计算当中以三者整体为一个要素元进行计算。流域生物信息流输移包括了非生命个体（即不具生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移和生命个体（即具有生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移（具体假设见前言第四段）。而生命个体（即具有生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移包括了客观实际上的生命个体空间移动所指征的生物信息的输移和计算形式上的上下游共有但并无空间迁移的生物信息的输移，后者作为流域生物信息流计算的辅助项，对非生命个体（即不具生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移的计算不产生任何影响，只影响对生命个体（即具有生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移结果的阐释（具体见方法 1.3 节第一段）。在通常分析生命个体（即具有生命活性的生物物质）所指征的生物信息的输移的时候主要关注环境过滤效应（即生命个体是否可以在连续空间上可生存），而过滤效应对是真实的个体空间迁移还是固有的物种同时分布问题并不做区分（具体见方法 1.3 节第一段）。关于这一点，先前的文献中有所解释，我们基于审稿人提出的问题在修改稿中予以修改补充说明，以解读者可能有的同样的疑问。

近年来不断有各种各样的关于 eDNA 输移的研究，Jo 在 freshwater biology 发表的 meta 分析中显示真核生物（鱼类为主）的 eDNA 可监测输移距离最小 2.6 m，最大 13.2 km，中位数 154.1 m，平均值 217.6 m。当然，这个可监测输移距离与流量流速正相关。他的数据与本研究的结果并不冲突（具体见讨论 3.2 节第四段）。

用 eDNA 监测所获得的可检出生物多样性，包括了非生命个体（即不具生命活性的生物物质）生物信息所指征的生物多样性和生命个体（即具有生命活性的生物物质）生物信息所指征的生物多样性。】

14. L136“（公式 2）”，建议再检讨。

修改说明：【如上】

15. L168“图 2”，存在 31 个点，而只收集了 30 个样品。请确认。

修改说明：【非常感谢审稿人的提醒。一共 30 个断面，30 个样品，已在图 2 中修改确认。】

16. L174-L175“不同相邻断面间的 eDNA 输移效率与上下游采样断面样品检出物种数比值负相关 （图 3）”，请添加统计结果。

修改说明：【非常感谢审稿人的建议。已在图 3 中添加了相关统计值 R^2。】

17. L177“图 3”，右边的图，个人觉得也存在错误，因为公式 1 存在争议。

修改说明：【非常感谢审稿人的评论。公式 1 和公式 2 里的 e（流域生物信息流输移效率），以及流域生物信息流计算框架内所有的 e 并不是准确的物理意义上的流域生物信息流输移效率，而是用以计算的具有物理意义上的流域生物信息流输移效率、物理意义上的逆向流域生物信息流效率，以及上下游样点共有生物类群的生物信息的补充形式上的流域生物信息流输移效率。相关问题已在前言部分第四段和方法部分 1.3 节第一段做了相关说明。】

18. L252“进而造成不同类群的 eDNA 可监测距离的差异性”，这里我们常说的是大型生物身上脱离的 eDNA，本研究的对象不一定会有那么大的差异。并且你们使用了 0.22 的滤纸过滤，个人觉得不会有那么大的差异。

修改说明：【非常感谢审稿人的评论。本研究中 eDNA 包括了大型生物身上脱离的 eDNA 和环境微生物的 eDNA 及其生命体本身（具体见前言第四段和方法 1.3 节第一段）。不同类群会有差异，差异的大小取决于 eDNA 来源及其形式，来源和形式会影响其降解速率，这个和滤膜孔径无关。】

19. L250-L252“eDNA 的不可检出主要取决于两个层面的因素：eDNA 片段降解至短于监

测扩增片段长度[27]，可检出 eDNA 片段的浓度降解或稀释至低于检出限[28]。eDNA 降解受初始片段长度、初始浓度、降解速率等的影响[29, 30]，而 eDNA 的释放形态和释放率又存在较强的类群差异性[31]，进而造成不同类群的 eDNA 可监测距离的差异性 [32-35]。”这里是不是太否定自己的结果了。是想强调最初收集到的 eDNA 就浓度不高呢？如果是这样的话应该要讨论提高 eDNA 回收率的办法。

修改说明：【非常感谢审稿人的评论。这里是在阐述一种事实，尚未讨论到本研究的结果，也并未否定当前的结果。】

20. L257“比如在长江武汉段单样品的鱼类物种检出仅 26 种左右，检出度仅 26%左右。”为了避免这类误差 PCR 进行 3 重复是不够的。Yamamoto et al., (2017)的研究里 PCR 做了 8 重复，避免样品内的偏差。

修改说明：【非常感谢审稿人提供的信息。这是个潜在的需要考虑的问题，需要做个专题研究（包括测序平台测序过程中产生的标签跳跃误差等问题），进而在未来的常态化 eDNA 监测实施过程中确定标准规程。】

21. L265-L266“理论上来讲，上游对下游的流域生物信息流输入会增加下游的可检出生物多样性，虽然这一增加是非累积的[25]，但至少下游的可检出生物多样性应该不比上游少。”尽量多参考英文文献。Jo 今年发的 meta 分析里有说到在 eDNA 的移动距离。

修改说明：【非常感谢审稿人的建议。已增加了相关合适的参考文献。】

22. L281-282“eDNA 的降解受持留介质[42]、温度[43-45]、pH[45, 46]、紫外线[45]、营养状况[43, 47]、叶绿素[24]、环境微生物及胞外酶[27]等因素影响[38]”这里在背景里有提到，有些词用的不够地道。

修改说明：【非常感谢审稿人的批评。已进行相关修改完善。】

23. L311-L315“因为最初释放出来的长片段 eDNA 会随着时间的推移逐渐降解为短片段

eDNA，大片段 eDNA 降解过程缓冲了小片段 eDNA 的降解，使得小片段的可检测时间更长[29, 30, 48]，所以 eDNA 监测所用目标片段越小，eDNA 监测空间分辨率的可信度越小、覆盖度越大。监测样品抽滤过程中选用的滤膜孔径越大，收集到小片段 eDNA 的概率越小[49]，进而使得 eDNA 监测空间分辨率的可信度越大、覆盖度越小。” 不该一味的提长片段还是短片断，它们之间各有千秋。本研究中所使用的引物在别的研究里也被使用，所以扩增长度长就检测不到短片段只是很小部分的可能性。如果你们真认为是扩增长度的影响的话，最初就不该用这两对引物。个人认为特别是原核生物的 16S rRNA 基因的分类置信度设为 70%实在是太低的。估计很多序列基本上都是无法区分的。

修改说明：【非常感谢审稿人的评论。此处对长短片段的区分主要是阐述长片段和短片段在应用中会有所差异，所以在不同的监测目的下可以倾向性选择不同的片段长度。本研究中用的特定扩增片段长度的引物所得到的结果主要反映当前引物和当前片段长度的结果，在其他引物和片段长度的情况下，如果要参考本研究结果，需根据条件做一定的方向性调整。片段长度、滤膜孔径大小等都会对结果产生影响，在不同的监测目的下可以有不同的选择，不同的方法条件下的结果反映不同的情况，在监测结果的分析和阐释时，要保持对相关问题的清醒。此处的讨论之意并不在否定结果，也不在比较优劣，而在阐述差异，说明方法和结果的联动关系，强调结果具有一定的有效边界。】

24. L330“参考文献”，日本的文献作者的姓和名都搞错了。请重新确认。

修改说明：【非常感谢审稿人的提醒。先前用的系统导出的文献格式，现已对文献进行了信息确认和格式调整。】

作者针对“第 2 审稿人”审稿意见的修改与说明：

I 您对本文的详细评阅意见:

通过 eDNA 监测计算空间分辨率的可信度和覆盖度是一个很有意义的研究。

但是整个内容如背景方面和讨论部分有待完善的更好。

特别是计算的公式请在找人商量一下是否合理。

修改说明：【非常感谢审稿人的评论和建议。我们已根据审稿人的意见和建议对文章进行了重新梳理，补充了相关背景内容和方法说明，对讨论部分也进行了进一步完善。流域生物信息流计算的相关公式先前已和相关专家反复沟通过，并在两篇研究论文中获得审稿专家的认可（当中涉及的一些基本假设已在修改稿中进行了补充说明）。可信度和覆盖度的计算公式，其内在逻辑也已经比较清晰，我们在内部也经过探讨和分析。可能依然存在某些未被注意到的不合适的地方，应该也可以通过修改使其更为完善，希望审稿人不吝赐教。我们计划后面开展通过与距离相关的所监测到的物种累计曲线来评估本研究中 eDNA 监测空间分辨率的覆盖度，期待获得有意义的结果，希望后续研究能获得您的批评赐教。】

作者针对"第 3 审稿人"审稿意见的修改与说明：

该研究对长江中游 eDNA 监测的空间分辨率进行了量化研究。思路比较清晰，结果呈现逻辑性较强。但是方法部分描述不够清楚明确。文章存在的主要问题如下：

1.eDNA 测序使用的引物需要明确写出。

修改说明：【感谢审稿人的建议。已按要求修改补充（具体见方法 1.2 节第一段）。】

2.115 行，ddH2O。125 行，COI。

修改说明：【感谢审稿人的提醒。已进行修改。】

3.测序数据是否上传到公开数据库？每个样本的序列数是多少？不同样本序列数是否相同？

修改说明：【感谢审稿人的问题。测序数据已上传到公开数据库（CNGB，项目号 CNP0002410，包括本研究团队截至 2020 年长江中游所有 eDNA 监测数据，后续监测数据还在陆续准备上传中）。每个样本的序列数已在文章中（图 2）进行补充，不同样本的序列数不尽相同。】

4.对公式 2 求解用的软件/工具或代码应该写明。

修改说明：【感谢审稿人的建议。我们是在 Microsoft Excel 中利用演化算法对公式 2 进行规划求解。已在文中（方法部分 1.3 最后一段）补充。】

5.如何评估公式 2 求解得到的参数组数值的准确性？

修改说明：【感谢审稿人的问题。因为公式 2 是依靠规划求解来获得近似解，而非通过严格的公式求得解析解，所以每一次计算所得解都为近似解，通过对 30 组近似解进行统计，所获得统计值充当所选用的解（方法部分 1.3 最后一段）。】

6.不同断面的名称，以及不同区间应该在图 1 标注出来。

修改说明：【感谢审稿人的建议。断面已标出（从 MY1 到 MY30），区间即两个断面间。区段也已在图 1 中进行了标注。】

7.表 3 中的下划线和加粗意义是什么。

修改说明：【感谢审稿人的问题。下划线和加粗表示可信度/覆盖度达到平衡，或达到 80%、90%的阈值。已在表格下进行了标注说明。】

8.语言需要凝练。文中大量长句非常不利于阅读，如 255-259，266-269。需全文检查修改。

修改说明：【感谢审稿人指出的问题。已按要求进行全文检查修改，我们努力避免句子嵌套给读者带来的阅读和理解障碍，努力使句子的信息以顺承方式展开，便于理解。】

以下两个问题我比较感兴趣，想和作者讨论：

1.对可信度和覆盖度的计算，可否在原有公式基础上进行改良，加入环境因子参数，使得环境因子的影响直接在计算公式中体现？

修改说明：【感谢审稿人的问题。截至目前，尚未能够对环境因子的影响进行比较清晰的关系定量，所以暂时难以完成该任务。同时，本研究对 eDNA 输移过程是采取一个黑箱来处理，流域生物信息流估算结果已经总括了环境因子的影响，所以把环境因子在可信度和覆

盖度计算环节进行插入，从逻辑上也是不合适的。】

2.作者指出研究存在很大的局限性，结果不宜作为其他检测结果的定量解释。是否可以获取一些其他河流的测序数据进行验证，更好的说明本研究的适用程度？

修改说明：【感谢审稿人的问题。这个局限性主要来自于 eDNA 输移（流域生物信息流）本身的时空异质性，只在大尺度粗理化条件下具有参考意义，当时间和空间存在较大差异或者尺度存在较大差异的情况下，本结果可能就会显得不够准确不够精确，基于此一考虑，我们说本结果不宜直接作为其它监测结果的空间定量解释，如果经过时空条件对比，另外一个研究和本研究的条件相似，本研究结果也可以暂借作为其监测结果的空间定量解释，但需要谨慎。另外，eDNA 监测、测序和分析方法的差异也可能会对结果产生一定的影响，比如用长片段引物就与用短片段引物进行测序所反映的 eDNA 监测空间分辨率会有一定的差异，这个差异会有多大，需要通过实证研究来量化。

我们已经在几条不同规模的河流中开展了相关研究（结果尚未发表），不同流量河流的结果有明显的差异性（这个在先前的研究（Jo, T., Yamanaka, H., 2022. Meta-analyses of environmental dna downstream transport and deposition in relation to hydrogeography in riverine environments. Freshw Biol 67 (8), 1333-1343.）中也有所说明），同一可信度目标下，大型河流的 eDNA 监测空间分辨率更小（最小空间单元更大）。】